

THESIS

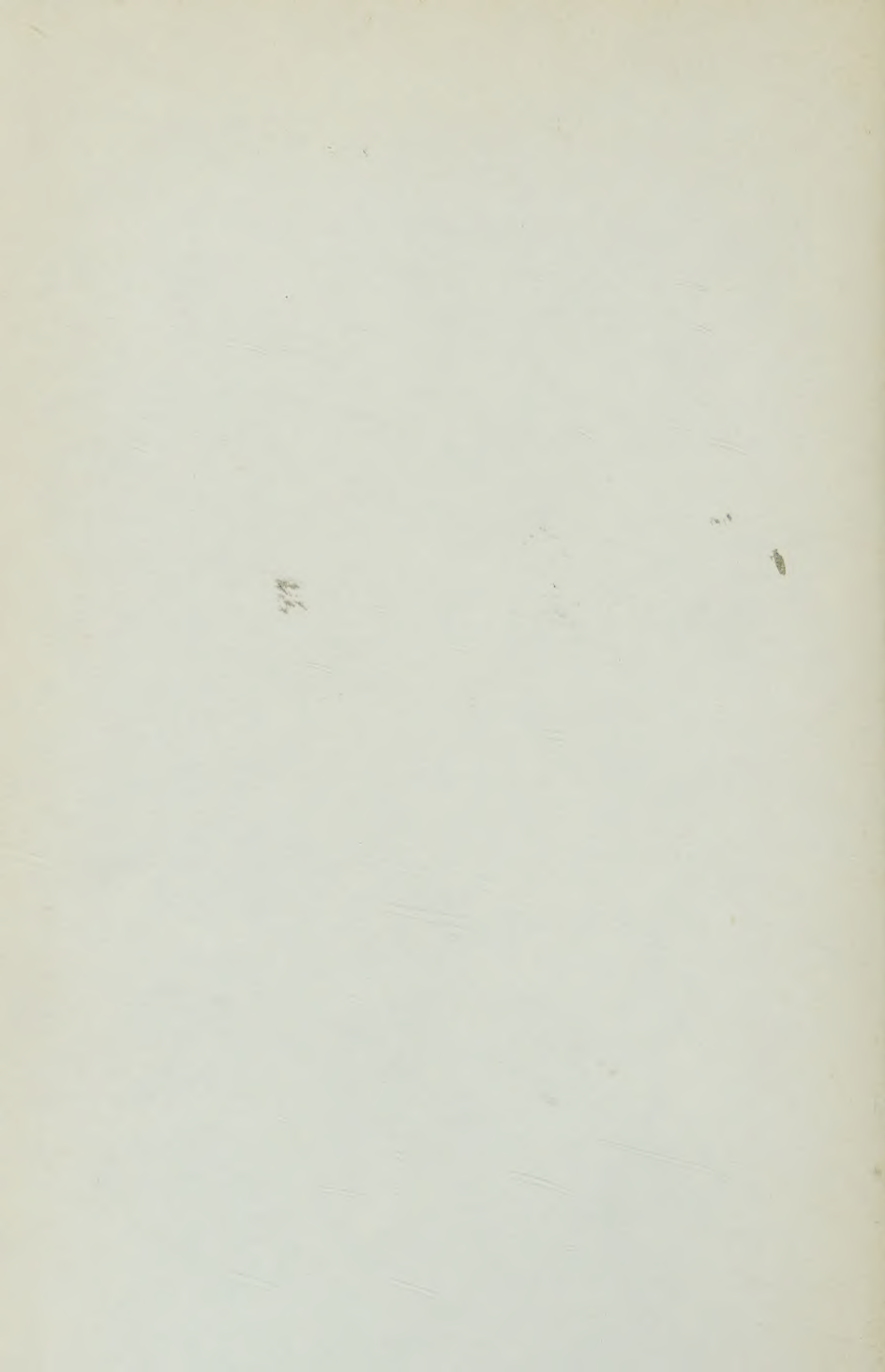
MUNICH

1965

Untersuchungen über die Wirkung von
Harnstoff auf die biologische Aktivität
von Insulin am epididymalen
Fettanhang der Ratte.

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

GUNTHER EMMERICH



Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor : Professor Dr. W. Seitz)

und dem Biochemischen Laboratorium der
Technischen Hochschule München
(Direktor : Professor Dr. W. Lamprecht)

Untersuchungen über die Wirkung von Harnstoff
auf die biologische Aktivität von Jnsulin am
epididymalen Fettanhang der Ratte .

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gunther Emmerich

aus

Saarbrücken

München 1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. K. Stuhlfauth

Mitberichterstatter : Prof. Dr. W. Seitz

Dekan : Prof. Dr. O. Hug

Tag der mündlichen Prüfung : 22. 6. 1965

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Lamprecht in der Zeit von März 1963 bis April 1964 an der Medizinischen Poliklinik der Universität München und am Biochemischen Institut der Technischen Hochschule München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Lamprecht gilt mein besonderer Dank für seine wertvolle Hilfe und verständnisvolle Unterstützung meiner Arbeit.

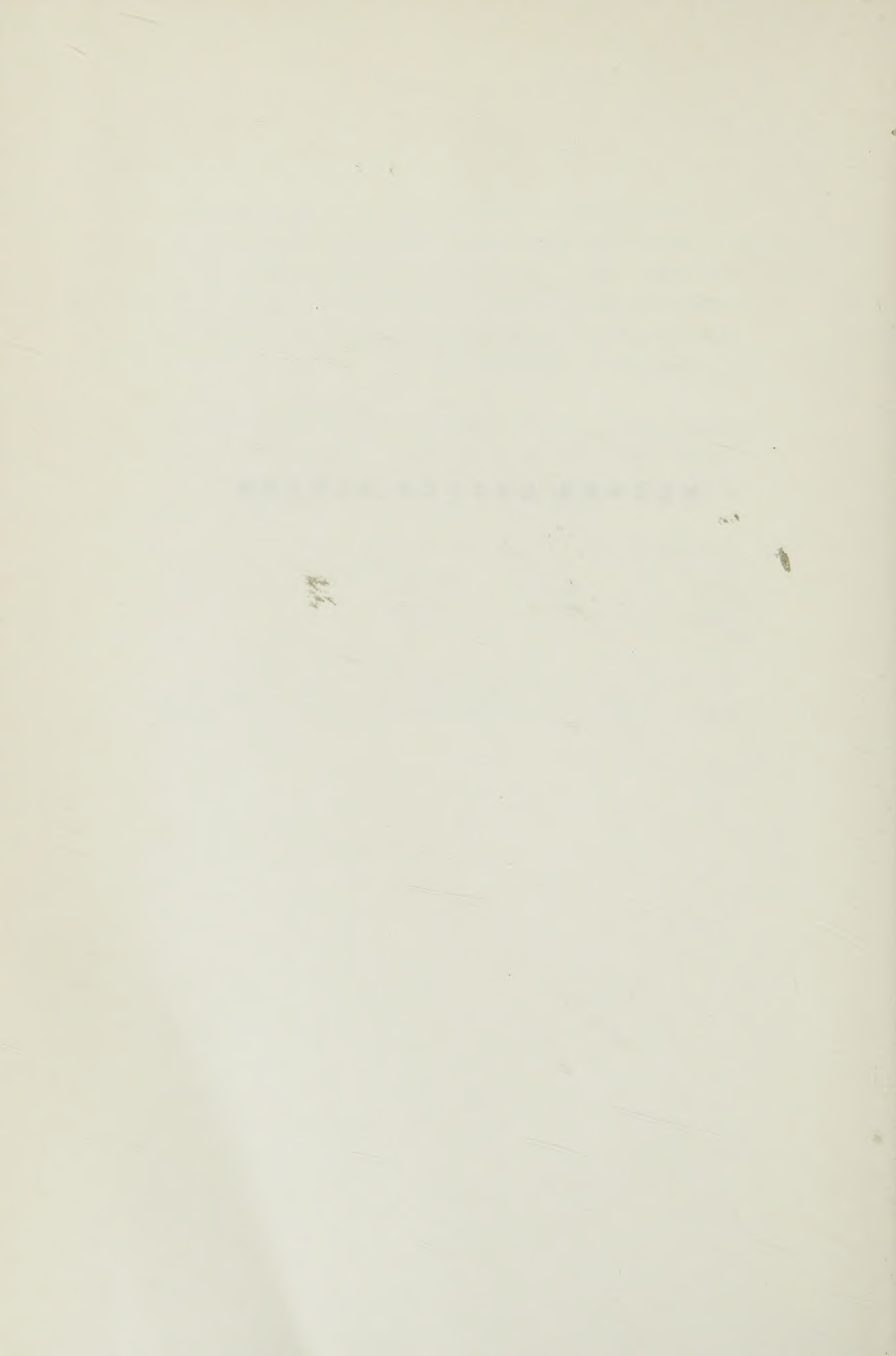
Den Herren Prof. Dr. K. Stuhlfauth und Prof. Dr. W. Seitz danke ich für ihre großzügige Förderung meiner Arbeit.

Herrn Dr. G. Schäfer möchte ich für seine zahlreichen Ratschläge meinen Dank aussprechen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

MEINEN LIEBEN ELTERN



Gliederung

Teil I

Einleitung

- 1.) Der Einfluß von Harnstoff auf Enzyme
- 2.) Aufgabe der Arbeit

Teil II

Material und Methoden

- 1.) Biochemische Grundlagen des angewandten Testverfahrens
- 2.) Prinzip des Versuches
- 3.) Schema der Methode und Auswertung
- 4.) Spezifität des Versuches
- 5.) Bestimmung der "insulin-like-activity"
- 6.) Kaninchenversuche

Teil III

Ergebnisse

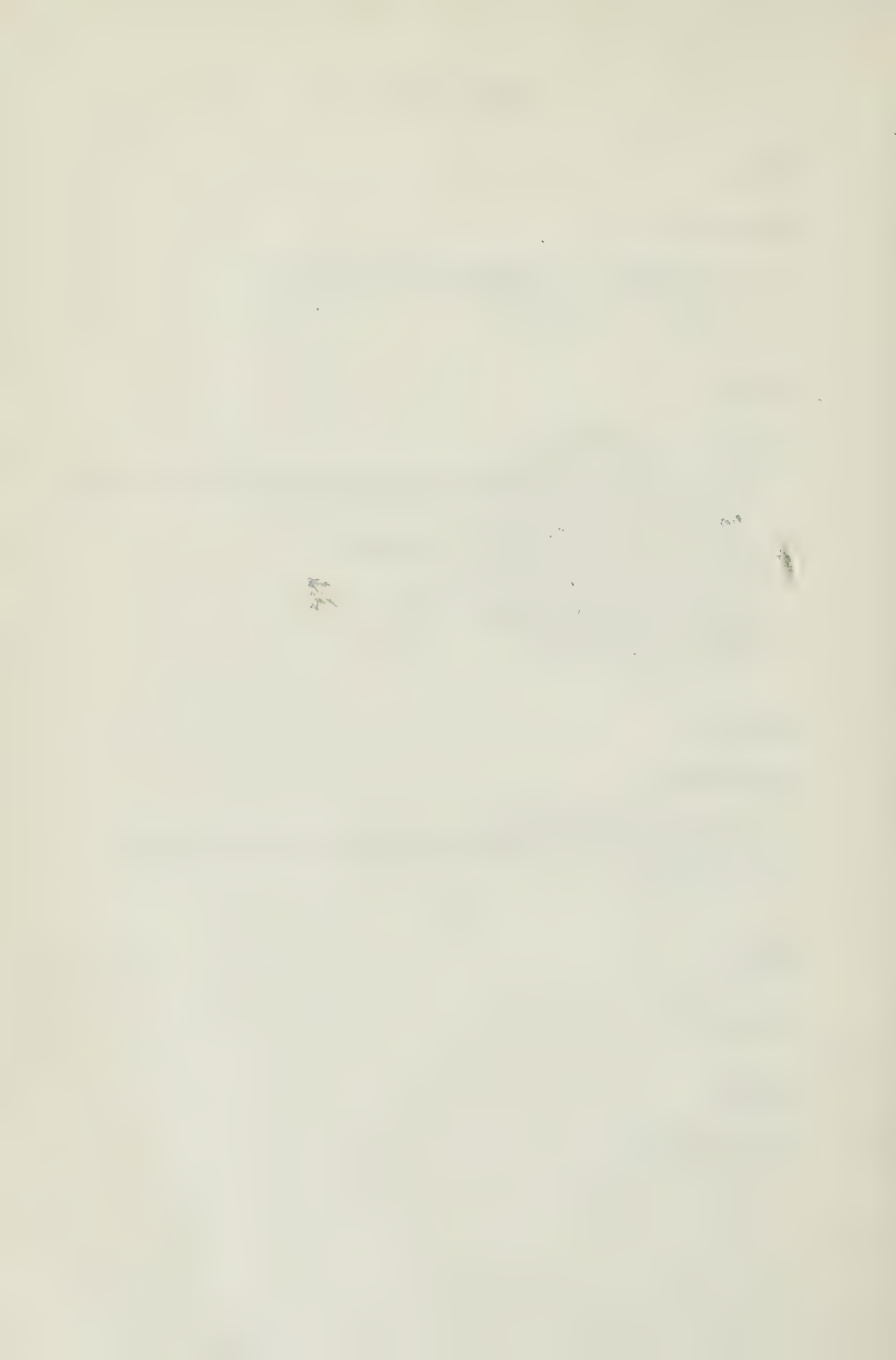
- 1.) Legende der Tabellen
- 2.) Präzisionsforderungen und Signifikanz-Berechnung
- 3.) Tabellen

Teil IV

Diskussion

Teil V

Zusammenfassung



I. Einleitung.

1.) Der Einfluß von Harnstoff auf Enzyme

Es ist heute noch unbekannt, ob nur einzelne Teile des Insulinmoleküles oder das ganze Molekül die bekannten physiologischen Wirkungen entfalten und ob für die verschiedenen Effekte verschiedene Molekülteile verantwortlich sind. Solange ist der Erfolg von Versuchen, die biologische Wirksamkeit des Hormones zu verändern, ungewiß. Die einfachste, gleichzeitig aber auch stärkste Veränderung eines Eiweißkörpers ist die Denaturation. Es galt bislang als einer der wichtigsten Unterschiede zwischen nativem und denaturiertem Eiweiß, daß das denaturierte Eiweiß biologisch inaktiv ist (1). Die Ergebnisse, die durch Denaturation mit Harnstoff gewonnen wurden, überraschten dadurch, daß auch das denaturierte Insulin noch den Blutzuckerspiegel des Kaninchens senkte, wenn auch mitunter in anderer Weise als das normale Insulin (nicht genannte Arbeit in der Tabelle von Anfinsen 2,3,4,5,6). Auch verschiedene Enzyme (7,8,9) zeigten nach der Inkubation in hochkonzentrierten Harnstofflösungen noch biologische Wirksamkeit. In anderen Untersuchungen steigerte die Anwesenheit von Harnstoff sogar die Enzymaktivität, ohne die Substrataffinität zu ändern (10). Andere Forscher regenerierten durch Behandlung mit Harnstoff bis zu einem gewissen Grade durch Hitze inaktivierte Enzyme (11).

2.) Aufgabe der Arbeit

Es ist Aufgabe der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob mit Harnstoff inkubiertes Insulin am epididymalen Fettanhang der männlichen Ratte wirksam ist. Diese von Renold und Mitarbeitern angegebene Methode erlaubt in vitro die Ausschaltung störender oder kompensierender Faktoren und damit eine direkte Messung der Insulinwirkung und eines möglichen Effektes von Harnstoff auf die "insulin-like-aktivität".

Am Kaninchen wird überprüft, ob diese Insulin-Harnstoff-Mischungen noch die Fähigkeit haben, in vivo den Blutzucker zu senken.

II. Methoden und Material.

1.) Biochemische Grundlagen des angewandten Testverfahrens.

Glucose kann auf 3 Wegen im Fettgewebe verarbeitet werden (12) :

- a.) Das Fettgewebe synthetisiert aus Glucose langkettige Fettsäuren und daraus Triglyceride (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24).
- b.) Das Fettgewebe baut Glucose zu Glycogen auf (14, 15, 16).
- c.) Das Fettgewebe oxydiert Glucose total zu CO_2 , entweder über den "Embden-Meyerhof-Weg" oder über den "Pentose-Phosphat-Cyclus" (16, 18, 19, 20).

Insulin kann auf alle 3 oben geschilderten Glucosestoffwechsel-Wege wirken:

- a.) Insulin steigert die Fettsäure-Synthese aus Glucose (18, 19, 20, 21, 25) und hindert die Abgabe von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe (15, 17, 26, 27, 28, 29, 30); Insulin fördert also die Lipogenese und hemmt die Lipolyse (15, 30, 32, 33).
- b.) Insulin erhöht die Glycogen-Synthese des Fettgewebes (14, 15).
- c.) Die Rate der Glucoseoxydation zu CO_2 wird durch Insulin stark vermehrt.

Genauere Untersuchungen mit markierten Substanzen ergaben, daß Insulin einerseits vornehmlich die Oxydation von C_1 zu CO_2 gegenüber der von C_6 zu CO_2 fördert (15,16,18,19,34,35) und daß andererseits der Einbau von C_1 und C_6 in Fettsäuren in gleicher Weise verstärkt wird, wobei doppelt so viel C_6 wie C_1 in Fettsäuren wiedergefunden wird (19,31).

Als Ausdruck des durch Insulin allgemein gesteigerten Stoffwechsels nimmt das Fettgewebe mehr Glucose auf (13,17,18,34,35,36,37,38,39,40).

Die Untersuchungen von Milstein mit Glucose-1- C^{14} und Glucose-6- C^{14} ergaben (41), daß C_1 schneller und in größerem Maße als C_6 im Fettgewebe oxydiert wird und daß die Bildung von $^{14}C_1O_2$ besonders empfindlich für Insulinmangel ist. Während der Quotient C_6 -Oxydation/ C_1 -Oxydation normalerweise etwa 0,18 beträgt, steigt er bei Insulinmangel stark an, wobei der absolute Betrag der C_6 -Oxydation unverändert bleibt. Das bedeutet eine Abnahme der C_1 -Verbrennung; andererseits sinkt aber durch graduelle Insulingaben die Oxydationsrate des C_1 noch unter den Ausgangswert. Milstein zog daraus den Schluß, daß sogar schon unter normalen Umständen der "Pentose-Phosphat-Cyclus" der Hauptweg der Glucoseoxydation im Fettgewebe ist und daß dieser Stoffwechselweg durch Insulin besonders beeinflußt wird. Insulin erhöht nicht nur die

totale Oxydationskapazität des Fettgewebes, sondern auch den Anteil des Pentose-Phosphat-Cyclus daran.

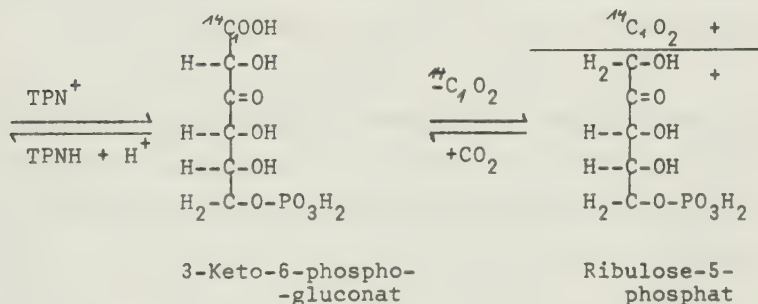
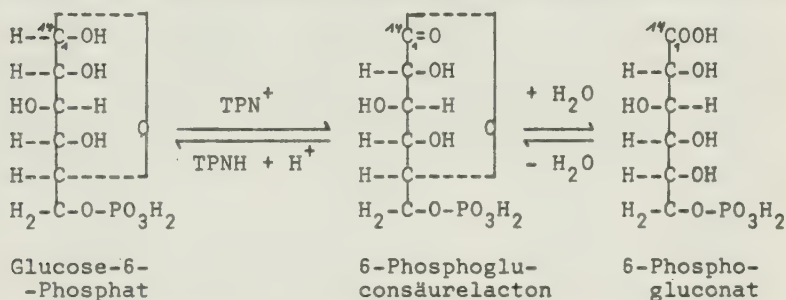
Diese spezielle Wirkungsweise von Insulin auf den Pentose-Phosphat-Cyclus wurde vielfach bestätigt (15,16,19,25,31), und zwar mit Untersuchungen verschiedenster Anordnungen. Die Bedeutung des Pentose-Phosphat-Cyclus für das Fettgewebe liegt darin, daß er TPNH liefert. Mit reduziertem Triphosphopyridinnucleotid ist erst überhaupt eine biologische Fettsäuresynthese möglich, weil damit der Wasserstoff für die Kettenverlängerung bereitgestellt wird (15, 19,41,42).

Der Embden-Meyerhof-Weg dagegen liefert nur DPNH, das unter anderem durch den Abbau von Glycerinaldehyd-3-Phosphat, über den Embden-Meyerhof-Weg, im Pentose-Phosphat-Cyclus ebenfalls gewonnen wird.

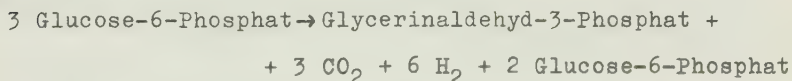
Diese Resultate ermöglichten es, eine zuverlässige biologische Bestimmungsmethode für Insulin zu entwickeln. In 4 Arbeiten gaben Martin, Renold, Sheps und Steinke und ihre Mitarbeiter einen Weg an (43,44,45,46), den viele Nachuntersucher bestätigten (16,23,31,34,47,48,49) und der für viele Untersuchungen über den Einfluß von verschiedenen Substanzen auf den Kohlenhydrat- und Fettsäure-Stoffwechsel des Fettgewebes und über die Wirkung von Insulin sehr geeignet ist (50,51,52).

2.) Prinzip des Versuches.

Im Pentose-Phosphat-Cyclus wird Glucose-6-Phosphat über Zwischenstufen zu Ribulose-5-Phosphat abgebaut, wobei im letzten Schritt 6-Phosphogluconat an C₁ decarboxyliert wird, nachdem zunächst sehr wahrscheinlich 3-Keto-6-Phosphogluconat gebildet wird (107, 108, 109).



Der gesamte Abbau liefert folgende Bilanz:



Sämtliche 3 Mole CO₂ entstehen aus der Decarboxylierung an C₁. Das Glycerinaldehyd-3-Phosphat mündet in den Embden-Meyerhof-Weg, kann jedoch bei der Verbrennung kein CO₂ liefern, das von C₁ stammt.

Die daraus gewonnenen C_2 -Bruchstücke, die in den "Pool" für aktivierte Essigsäure fließen, wie auch das dabei gebildete TPNH ermöglichen die Fettsäure-Synthese. Das Kohlendioxyd aus C_1 der Glucose geht dann verloren, wenn es nicht zur Carboxylierung von Brenztraubensäure zu Äpfelsäure benutzt wird, die in Oxalessigsäure übergeht, und so in den Zitronensäurecyclus eingeschleust wird. Übertrifft die Lipogenese den Glucoseabbau in dem Maße, daß ein Defizit an Oxalessigsäure entsteht, dann tritt die oben dargelegte Veränderung im Stoffwechsel ein. Da dem Fettgewebe jedoch in vitro nur Glucose zum Fettsäureaufbau zur Verfügung steht und es deshalb nicht mehr Fettsäuren synthetisieren kann als Glucose abgebaut wird, wird immer genügend Oxalessigsäure vorhanden sein und kaum CO_2 fixiert werden.

Glucose, die über den Embden-Meyerhof-Weg abgebaut wird, liefert natürlich ebenfalls CO_2 von C_1 her, aber Insulin stimuliert ja besonders den Weg über den Pentose-Phosphat-Cyclus.

Auf dem Umweg über Fettsäuresynthese aus Glucose und darauf folgenden Fettabbau wird fast kein CO_2 aus C_1 entstehen, da Insulin immer die Lipolyse hemmt.

Der Anteil an Glucose, der vom Fettgewebe zu Glycogen aufgebaut wird, ist sehr gering gegenüber der Menge, die der Verbrennung oder der Fettsäuresynthese zugeführt wird.

Schließlich ist bei fettfrei ernährten Ratten (s.u.) die Fettsäuresynthese und damit der oxydative Abbau von Glucose bevorzugt.

Unter Insulin-Einfluß stammt also der größte Teil des aus C_1 gebildeten CO_2 aus dem Pentose-Phosphat-Cyclus, und zwar aus dem Decarboxylierungsschritt an C_1 zu Ribulose-5-Phosphat. Mit der Messung der $^{14}CO_2$ -Bildung aus Glucose-1- C^{14} wird daher der weitaus größte Teil der metabolisierten Glucose erfaßt.

3.) Schema der Methode und Auswertung.

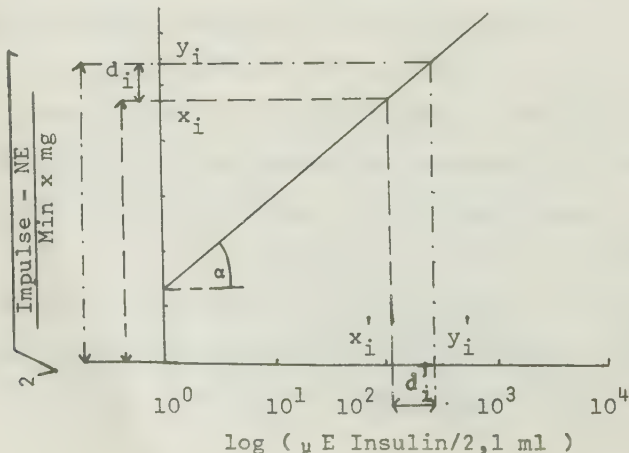
Bestimmten Mengen von Fettgewebe wird Glucose-1- C^{14} zugesetzt. Unter dem Einfluß des ebenfalls hinzugegebenen Insulines wird mehr CO_2 gebildet als in Abwesenheit des Hormones. Die Menge des an Hyamin adsorbierten und in einem Toluol-Szintillator gelösten $^{14}CO_2$ wird im Radio-Szintillations-Spectrometer gemessen. Die Meßwerte werden angegeben in Impulsen/Minute/mg Fettgewebe. Nach Sheps (45), Ditschuneit (47) und Weinges (34) ist bei Konzentrationen unter $1000 \mu E/ml$ die Quadratwurzel aus der Impulsrate eine lineare Funktion des Logarithmus der Insulinkonzentration. Im praktischen Versuch muß noch der Nulleffekt NE des Packard-Gerätes abgezogen werden.

Es gilt also:

$$\sqrt{\frac{\text{Impulse} - \text{NE}}{\text{Min} \times \text{mg}}} = f(\log \text{Insulin-Konz.})$$

Weinges und Wörner (34) fanden dazu noch eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Insulinkonzentration und dem Logarithmus der Impulsrate. Diesem Befund hat jedoch noch kein anderer Untersucher folgen können.

In der Praxis wird die Eichgerade durch 2 bekannte Insulinkonzentrationen Ins_1 und Ins_2 festgelegt, wobei ein Koordinatensystem mit linear unterteilter Ordinate für die 2. Wurzel der Impulsrate und logarithmisch unterteilter Abszisse für den Logarithmus der Insulinkonzentration benutzt wird. Es werden in den Ergebnissen unserer Versuche die Impulsraten aller durch Harnstoff veränderten Insulinproben eingetragen und die zugehörigen Insulinkonzentrationen, denen diese Aktivität entspricht, ermittelt. Die Differenz d_i' zwischen tatsächlich eingesetzter Insulinmenge x_i' und der gefundenen y_i' , die theoretisch - ohne Harnstoff - diese Aktivität besitzt, sagt aus, in welchem Maße der Harnstoff die biologische Aktivität des Insulines am Fettgewebe, gemessen durch die $^{14}CO_2$ - Bildung aus Glucose-1- C^{14} , verändert hat.



Allerdings wurden in vielen Versuchen Steigerungen der $^{14}\text{CO}_2$ - Abgabe gefunden, deren Impulsraten zu Insulinkonzentrationen gehörten, die außerhalb des linearen Anteiles der Funktion lagen. Alle diese Ergebnisse konnten nicht auf die oben angegebene Weise ausgewertet werden. Verglichen werden deshalb nur die Impulsraten x_i und y_i der Funktionen. Es wird davon ausgegangen, daß die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung als Ausdruck des Glucosestoffwechsels in jedem Fall eine Funktion der Insulinkonzentration ist, auch wenn die lineare Abhängigkeit der Impulsrate von dem Logarithmus der Insulinkonzentration in bestimmten Bereichen nicht mehr gegeben ist. Um zu einheitlichen, vergleichbaren Ergebnissen zu kommen, wurde ausschließlich dieses Verfahren angewandt.

4.) Spezifität des Versuches.

Es ist immer wieder darauf hingewiesen worden, daß mit dieser Methode der Insulin-Bestimmung auch Faktoren gemessen werden, die sich von Insulin unterscheiden (44, 46), die aber auch zu einer erhöhten $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus Glucose führen. Deshalb wurde der Ausdruck "insulin-like-activity" geprägt (31, 43, 53, 54, 55, 56). In unserer Versuchsanordnung, ohne Blut, könnten solche Stoffe, vor allem einige Hormone, nur im Fettgewebe enthalten sein; ihre Konzentration im Gewebe ist aber gegenüber der der zugegebenen Insulinmengen so gering, daß sie keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben können und alle gemessenen Effekte aus der Wirkung von Insulin resultieren.

5.) Bestimmung der "insulin-like-activity"

51) Versuchstiere

Sprague-Dawley-Ratten im Gewicht von 120-150 g.

Die Tiere werden zwischen 4-8 Tagen, bevor sie zu einem Versuch verwandt werden, fettfrei mit einem Spezialfutter (Dr.Schole) ernährt; die übrige Zeit werden die Tiere mit Altrumin-R ernährt.

52) Reagenzien.

5200) Schwefelsäure p.a. 10%ig

5201) Krebs-Ringer-Lösung:

NaCl	8,26 g = 141,0 mMol
CaCl ₂ + 2 H ₂ O	335,9 mg = 2,284 "
KCl	422,0 " = 5,66 "
MgSO ₄ + 7 H ₂ O	350,0 " = 1,42 "
KH ₂ PO ₄	193,5 " = 1,42 "

ad 1000 ml aqua bidestillata

5202) Natriumbicarbonatlösung:

NaHCO₃ 2,875 g = 34,2 mMol

ad 200 ml aqua bidest.

5203) Glucose (sog. "kalte" Glucose) :

D-Glucose 16,25 g = 90,3 mMol

5204) Atmungsgemisch :

95 % O₂

5 % CO₂

5205) Inkubationslösung :

Folgende Lösungen werden in der angegebenen Reihenfolge in einen Erlenmeyer-Kolben pipettiert :

- 52o5o) 54,5 ml Krebs-Ringer-Lösung (52o1)
- 52o51) 1 " "kalte" Glucose (52o3)
- 52o52) 9,5 " Natriumbicarbonatlösung (52o2), die vorher 5 Minuten lang mit reinem CO₂ begast wurden. Dieses Gemisch wird 1o Minuten lang mit Atmungsgemisch (52o4) begast; am pH-Meter wird der pH-Wert der Lösung kontrolliert und, wenn nötig, durch Schütteln überschüssiges CO₂ ausgetrieben und die Lösung auf einen pH-Wert von 7,3 - 7,4 eingestellt.
- 52o6) Radioaktiv markierte Glucose :
- ¹⁴C-1-Glucose. Der Inhalt einer Ampulle, o,o5 mC, wird in 25 ml aqua bidest. gelöst. O,1 ml dieser Lösung entsprechen einer Radioaktivität von o,2 μ C.
- 52o7) Insulin-Lösungen :
- 52o7o) Standard-Lösung : 9,1 mg Rinderinsulin (1omal umkristallisiert, glukagonfrei, o,39 % Zinkgehalt) werden in 1o ml $\frac{N}{10}$ HCl gelöst. Die Standard-Lösung enthält 2o E/ml Insulin.
- 52o71) Lösung a : o,1 ml Standardlösung ad 1oo ml mit aqua bidest. verdünnen. 1 ml Lösung a enthält 2o.ooo μ E Insulin
- Die Standard-Lösung wird unbegrenzt im Kühlschrank aufbewahrt, die Lösung a nur 5 Tage.

52072) Alle weiteren Lösungen werden täglich frisch aus der Lösung a durch entsprechende Verdünnungen mit Inkubationslösung (5205) hergestellt. Die Endkonzentrationen in den Trögen betragen 50, 100, 200, 300, 400, 500 und 1000 μ E/2,1 ml.

5208) Harnstoff

Urea puriss. cryst. Merck

Reinheitsforderung : mindestens 99,8 % Gehalt.

5209) Phosphat-Puffer (0,13-molar) :

KH_2PO_4 (nach Sörensen) 1,7692 g/100 ml

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ (") 2,314 g/100 ml

Die beiden Lösungen werden miteinander auf einen pH-Wert von 6 - 6,1 eingestellt, unter ständiger Kontrolle am pH-Meter.

5210) Harnstoff-Insulin-Mischungen :

	10 E	5 E	4 E	3 E	2 E	0,5 E	Insulin
+ 3g	-	-	-	-	-	-	+ 3 g
+ 3,6g	-	-	-	-	-	-	+ 3,6g Harnstoff
+ 4,2g	-	-	-	-	-	-	+ 4,2g

und

5E Insulin + (+ 0,6g; + 1,2g; + 1,8g; + 2,4g; + 4,8g Harnstoff)

ad 10 ml Phosphat-Puffer (5209).

Je 0,1 ml dieser Lösungen werden mit 9,9 ml Inkubationslösung (5205), also 1:100 verdünnt.

In 0,1 ml dieser Verdünnungen sind demnach 50, 200, 300, 400, 500 und 1000 μ E Insulin enthalten und sie sind 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8 X 10^{-2} -molar in Bezug auf den Harnstoff.

5211) Szintillator-Flüssigkeit :

4,0 g Diphenyloxazol (PPO)

+

0,1 g 1,4-bis-2- (5-Phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP).

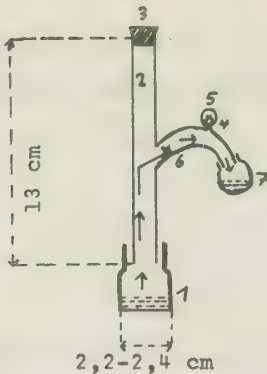
ad 1000 ml Toluol p.a.

5212) Hyamin: 1-molare Lösung von p-(Diisobutyl-Cresoxyäthoxyäthyl)- Dimethylbenzylammoniumhydroxyd in Methanol. (PPO, POPOP und Hyamin der Firma Packard & Co., La Grange Illinois - USA).

5213) Beschreibung des Reaktionsgefäßes :

Zusammen mit Herrn Dr. Schäfer und mir wurde ein neues Inkubationsgefäß konstruiert :

Es besteht aus einem Trog, der sich nach oben mit einem Schliff öffnet, in den ein weitleumiger Kamin, an der Seite mit einer Feder befestigt, eingesetzt wird. Der Trog hat kein Zentralgefäß und faßt maximal $\approx$ 9 ml; der Durchmesser des kreisförmigen Bodens beträgt 2,2 - 2,4 cm. Der weitleumige Kamin, 13 cm lang, ist mit einem Gummistopfen vollkommen dicht verschlossen; an der Seite trägt er eingesmolzen einen gebogenen Seitenarm, mit der Konvexität nach oben, an dessen Ende eine kleine Birne angebracht wird, die maximal 2,7 ml faßt. Lateral von dem Gipfel des Seitenarmes, über dessen absteigendem Schenkel, sitzt ein kleiner offener Zapfen, den eine Kappe aus Penicillingummi verschließt.



- 1.) Trog
- 2.) Kamin
- 3.) Gummistopfen
- 4.) Zapfen mit
- 5.) Kappe
- 6.) Seitenarm
- 7.) Birne

53.) Durchführung der Bestimmung :

5300) Auf den Boden des Troges werden 0,1 ml Glucose-1-C¹⁴ pipettiert.

5301) Für eine Versuchsreihe werden

in 2 Tröge die 1. Eichlösung Ins₁ (1000, 500 μ E/ 2,1 ml),

in 2 Tröge die 2. Eichlösung Ins₂ (50, 100, 200, 300, 400 und 500 μ E/ 2,1 ml), in alle restlichen 8 Tröge 0,1 ml der zu untersuchenden Insulin-Harnstoff-Mischungen pipettiert, jeweils in mindestens 2 dieselbe.

5302) Mit Inkubationslösung werden alle Tröge auf 2,1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

5303) Sorgfältig verschlossen werden die Tröge auf der Analysenwaage auf 0,0001 g genau gewogen.

5304) Durch einen Schlag an den Kopf, Dekapitieren und Entbluten werden die Ratten getötet. Durch einen queren Schnitt wird die Bauchhöhle eröffnet und mit einer Pinzette werden unter größtmöglicher Gewebsschonung die epididymalen Fettanhänge gefaßt und mit einem Schnitt, der ein kurzes Stück ent-

lang der Gefäße führt, abgetrennt. Die einzelnen Zipfelstücke werden sofort in die Inkubationslösung der einzelnen Tröge verbracht.

5305) Die Tröge werden daraufhin nochmals gewogen. Die Gewichtsdifferenz ergibt die Fetteinwaage pro Trog.

5306) Die Kamine werden aufgesetzt und der ganze Trog, an einer Stativstange hängend, in einen Warburg-Apparat bei 37°C gesetzt.

5307) 3 Stunden Inkubation unter Schütteln bei 37°C im Wasserbad.

5308) Die Tröge werden aus dem Wasserbad genommen und an den Stativständer gehängt. Mit einer Tuberkulinspritze mit langer, gebogener Kanüle werden durch die Gummikappe des Zapfens 0,4 ml Hyamin (5212) direkt in die Birne gespritzt. Durch den Kamin werden dann mit einer gläsernen Tuberkulinspritze 0,2 ml Schwefelsäure (5200) in die Inkubationslösung gespritzt, wodurch das Fettgewebe enteweißt wird, die biologischen Reaktionen gestoppt werden und das $^{14}\text{CO}_2$ frei gesetzt wird.

5309) Zur vollständigen Austreibung des $^{14}\text{CO}_2$ und seiner quantitativen Adsorption an das Hyamin werden die Tröge 2 weitere Stunden bei 37°C im Warburg-Apparat geschüttelt.

5310) Die Tröge werden aus dem Wasserbad genommen und an den Stativständer gehängt. Die Seitentröge werden abgenommen und das Hyamin mit dem adsorbierten $^{14}\text{CO}_2$ mit 4x2 ml Toluol-Szintillator (5211) in kaliumarme Spezialglas-

gefäße der Firma Packard gespült.

- 5311) Die Radioaktivität des $^{14}\text{CO}_2$ wird im automatisch registrierenden Radio-Szintillations-Spectrometer (Firma Packard) gemessen.

6.) Kaninchenversuche.

In der Industrie entspricht 1mg kristallisierten Insulines 22 E; Aus praktischen Erwägungen wird in vielen Versuchen 1mg 20E gleichgesetzt. Wir folgen hier diesem Beispiel.

61) Versuchstiere

Kaninchen im Gewicht von 3,8 - 5,5 kg. Die Tiere werden mit Altrumin-K, roten Rüben und Grummet ernährt.

62) Reagenzien.

621) Physiologische Kochsalzlösung

0,9%ige, isotonische, sterile NaCl-Lösung

622) Insulin-Harnstoff-Mischungen (Ins + HS)

622o) 100 mg Rinderinsulin $\hat{=}$ 2000 E

+ 4,2 g Harnstoff

ad 10 ml physiologischer Kochsalzlösung

Mit 1 - 2 Tropfen $\frac{1}{10}$ HCl wird leicht angesäuert, damit sich das Insulin löst. Die Lösung enthält 200 E/ml und ist 7-molar in Bezug auf den Harnstoff. Sie wird 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die verdünnte Lösung enthält 2 E/ml und ist 7×10^{-2} -molar in Bezug auf den Harnstoff.

6221) 10 mg Rinderinsulin werden in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst, wobei mit einigen Tropfen $\frac{N}{10}$ HCl angesäuert wird. Die Lösung enthält 20 E/ml Insulin.

1 ml dieser Lösung ($\hat{=}$ 20 E)

+ 4,2 g Harnstoff

ad 10 ml physiologischer Kochsalzlösung.

Diese Lösung enthält 2 E/ml Insulin und ist

7-molar in Bezug auf den Harnstoff.

623) Reine Insulin-Vergleichslösung (Ins)

10 mg $\hat{=}$ 200 E Insulin

ad 10 ml physiologischer Kochsalzlösung

Mit einigen Tropfen $\frac{N}{10}$ HCl wird angesäuert.

624) Für die Glucose-Bestimmung werden folgende Reagentien benötigt (Firma C.F. Boehringer / Mannheim) :

6240) Puffer-Enzym-Gemisch

0,12-molarer Phosphat-Puffer (pH = 7)

40µg Peroxydase/ml (POD)

250µg Glucose-Oxydase/ml (GOD)

ad 600 ml aqua bidest.

6241) Chromogen

6,6 mg o-Dianisidinhydrochlorid/ml (D)

ad 8 ml aqua bidest.

6242) Glucose-Standard-Lösung

91µg Glucose/ml

6243) 6%ige Perchlorsäure

Das Puffer-Enzym-Gemisch (6240) und das Chromogen (6241) werden im Verhältnis 100:1 miteinander zum Glucose-Reagenz vermischt.

63) Durchführung

631) Spritzen, Kanülen, Pipetten und Uhrgläschen werden heparinisiert.

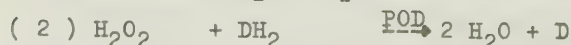
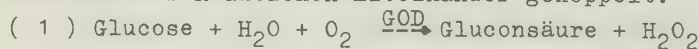
632) 1 ml Perchlorsäure wird in jedes Reagenzglas vorgelegt.

633) Die Ohren der nüchternen Kaninchen werden rasiert, die Ohrvene etwas mit Alkohol gesäubert und gereizt. Ein Kaninchen erhält die Insulin-Harnstoff-Mischung 6220 oder 6221, wobei von 2 E/4 kg bis zu 4,5 E / 4,9 kg variiert wird, ein zweites Tier erhält die reine Insulin-Vergleichslösung 623, wobei von 2 E/ 4 kg bis zu 4 E/ 4 kg variiert wird. In regelmäßigen Abständen wird die Ohrvene mit einer Kanüle angestochen und das herausfließende Blut mit einem Uhrgläschen aufgefangen. 0,1 ml jeder Blutprobe werden in zwei Reagenzgläser pipettiert.

64) Enzymatische Glucose-Bestimmung.

641) Prinzip

Es sind zwei Reaktionen miteinander gekoppelt:



DH_2 ist farblos, D ein rotbrauner Farbstoff.

Die Menge des Farbstoffs ist ein Maß für die umgesetzte Glucose-Menge.

642) Ausführung.

6420) Das enteiweißte Blut wird 5 - 10 Minuten lang zentrifugiert (ca. 3000 U/Min.).

6421) Es werden angesetzt:

Reagentien-Leerwert	5,0 ml Glucose-Reagenz
	0,2 ml aqua bidest.
Glucose-Standard-Wert	5,0 ml Glucose-Reagenz
	0,2 ml Glucose-Standard
zu untersuchende Proben	5,0 ml Glucose-Reagenz
	0,2 ml enteiweißter Überstand

6422) Die Ansätze bleiben 35 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird die Extinktion aller Proben und des Standard-Wertes gegen die Extinktion des Leerwertes in 1 cm-Küvetten bei der Wellenlänge $\lambda = 436 \text{ m}\mu$ gemessen.

643) Berechnung

Die Extinktion der Proben wird auf die des Standardes bezogen. Der Glucose-Standard-Wert enthält 18,2 μg Glucose pro Reaktionsansatz, was 1 mg/ml Blut entspricht. Daher gilt

$$\frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 = \text{mg\% Glucose.}$$

III. Ergebnisse.

1.) Legende der Tabellen.

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
82	e	8,500	6	9,442	0,942	0,887
112	2	10,135	2	8,373	-1,762	3,105

a.) Nr. : Nummer des entsprechenden Versuches. Ausgeführt wurden insgesamt 135 Versuche.

b.) x_i : erwartete, theoretische Werte der Impulsrate einer bestimmten Insulinkonzentration, entweder direkt im Versuch gemessen - die 1. Spalte gibt dann die Anzahl der Doppelbestimmungen an - oder aus der Eichgeraden ermittelt - in der 1. Spalte mit e bezeichnet.

c.) y_i : bei derselben Insulinkonzentration gefundene tatsächliche Werte der Impulsrate - die 1.) Spalte gibt wieder die Anzahl der Doppelbestimmungen an.

d.) $\pm d_i$: die Differenz $y_i - x_i \begin{matrix} \geq \\ < \end{matrix} 0$

2.) Präzisionsforderungen und Signifikanz-Berechnung.

a.) Jeder Versuch, in dem sich eine Eichgerade mit weniger als 10^0 Steigung ergab ($\alpha < 10^0$), wurde verworfen.

10^0 ist die geringste Steigung, die sich in der Arbeit Martins und seiner Mitarbeiter (43) findet.

b.) Bei mehr als 2 Doppelbestimmungen wurden die Extremwerte, wenn sie um mehr als 30 % differierten, ausgeschieden und nur der oder die verbleibenden Werte zur Mittelwertbestimmung verwandt. 30 % entspricht dem von Steinke (46) angegebenen Präzisionsindex der Methode.

c.) Signifikanz-Berechnung.

Geprüft wird der Unterschied zwischen 2 Meßreihen, die eine bilden alle Werte x_i , die andere alle Werte y_i . Angewandt wird die t-Verteilung für paarweise Anordnung der Meßwerte. Man geht von der Hypothese aus, daß der Unterschied zwischen dem erwarteten Wert x_i und dem tatsächlich gefundenen Wert y_i gleich 0 ist. Der Unterschied d_i ist dann statistisch signifikant, wenn diese 0-Hypothese mit einer geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit als 5% ($P = 0,05$) verworfen werden muß, und sehr wahrscheinlich signifikant, wenn diese 0-Hypothese mit einer geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit als 10% verworfen werden muß ($P = 0,1$)

Meßreihe I

Meßreihe II

x_i

y_i

Gebildet werden die Differenz $d_i = y_i - x_i$ und die Quadrate d_i^2 .

Daraus ergeben sich bei n verglichenen Paaren von Meßwerten:

$$\text{Varianz } s^2 = \frac{Sd_i^2 - \frac{(Sd_i)^2}{n}}{n - 1}$$

$$\text{Standardabweichung } s = \sqrt{\frac{Sd_i^2 - \frac{(Sd_i)^2}{n}}{n - 1}}$$

$$t = \frac{\frac{Sd_i}{n}}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} \quad (\text{in den Tabellen "t}_{\text{emp}} : \text{empirisch"})$$

Der Bereich der Irrtumswahrscheinlichkeit, in dem t liegt, wird mit der Tabelle von Fisher (89) festgestellt

($t_{\text{tabularisch}} = t_{\text{tab}}$)

3.) Tabellen

Tabelle 1

Angesetzte Mischung (10 ml) : 1-molare Harnstoff-Lösung
+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 1×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
112	2	10,135	3	8,494	-1,641	2,693
113	2	6,900	3	8,441	1,541	2,375
114	2	7,352	3	8,076	0,724	0,524
115	2	6,068	3	8,952	2,884	8,317
117	2	8,211	3	9,469	1,258	1,583

Anzahl der Versuche $n = 5$

Freiheitsgrade $n-1 = 4$

Varianz $s^2 = 2,737$

Standardabweichung $s = 1,654$

$t_{P=0,05} = 2,776 > t_{\text{emp}} = \underline{1,288}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 2

Angesetzte Mischung (10 ml) : 2-molare Harnstoff-Lösung
+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 2×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
82	e	8,500	6	9,442	0,942	0,887
112	2	10,135	2	8,373	-1,762	3,105
113	2	6,900	2	9,050	2,150	4,623
114	2	7,352	2	7,355	0,003	0
115	2	6,068	1	8,643	2,575	6,631
117	2	8,211	2	10,753	2,542	6,462

Anzahl der Versuche $n = 6$

Freiheitsgrade $n-1 = 5$

Varianz $s^2 = 2,955$

Standardabweichung $s = 1,719$

$t_{P=0,05} = 2,571 > t_{\text{emp}} = \underline{1,531}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 3

Angesetzte Mischung (10 ml) : 3-molare Harnstoff-Lösung
+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 3×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
118	2	8,222	3	8,907	0,685	0,469
119	2	7,649	4	8,329	0,680	0,462
120	2	7,955	3	9,499	1,544	2,384
121	2	7,823	3	8,348	0,525	0,276
122	2	8,013	3	7,992	-0,021	0

Anzahl der Versuche $n = 5$

Freiheitsgrade $n-1 = 4$

Varianz $s^2 = 0,315$

Standardabweichung $s = 0,561$

$t_{P=0,1} = 2,132 < t_{\text{emp}} = \underline{2,721} < t_{P=0,05} = 2,776$

Urteil : Ein signifikanter Unterschied ist sehr wahrscheinlich .

Tabelle 4

Angesetzte Mischung (10 ml) : 4-molare Harnstoff-Lösung
+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 4×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
118	2	8,222	2	8,797	0,575	0,331
120	2	7,955	2	9,204	1,249	1,560
121	2	7,823	3	8,158	0,335	0,112
122	2	8,013	2	7,319	-0,694	0,482
80	e	11,000	7	12,192	1,192	1,421

Anzahl der Versuche $n = 5$

Freiheitsgrade $n-1 = 4$

Varianz $s^2 = 0,624$

Standardabweichung $s = 0,790$

$t_{P=0,05} = 2,776 > t_{\text{emp}} = \underline{1,500}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 5

Angesetzte Mischung (10 ml) : 5-molare Harnstoff-Lösung
+ 0,5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 5×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 50 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
123	2	6,905	4	6,121	-0,784	0,615
124	2	6,740	3	6,427	-0,313	0,098
125	2	5,833	3	5,750	-0,083	0,007
126	2	6,926	2	6,948	0,022	0
130	2	4,926	5	5,558	0,632	0,399

Anzahl der Versuche $n = 5$

Freiheitsgrade $n-1 = 4$

Varianz $s^2 = 0,266$

Standardabweichung $s = 0,516$

$t_{P=0,05} = 2,776 > t_{\text{emp}} = \underline{-0,457}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 6

Angesetzte Mischung (10 ml) : 5-molare Harnstoff-Lösung
+ 2 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 5×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 200 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
36	e	5,600	2	6,362	0,762	0,581
37	e	6,300	2	7,610	1,310	1,716
38	e	8,300	2	7,417	-0,883	0,780
39	e	7,200	2	8,440	1,240	1,538
43	e	6,100	2	7,126	1,026	1,053
63	2	6,936	3	8,216	1,280	1,638
128	e	7,300	2	6,646	-0,654	0,428
131	e	9,400	1	10,135	0,735	0,540
133	e	6,400	2	6,901	0,501	0,251
134	e	6,800	2	7,572	0,772	0,596

Anzahl der Versuche $n = 10$

Freiheitsgrade $n-1 = 9$

Varianz $s^2 = 0,601$

Standardabweichung $s = 0,775$

$t_{P=0,05} = 2,262 < t_{\text{emp}} = 2,486 < t_{P=0,01} = 3,250$

Urteil : Der Unterschied ist signifikant.

Tabelle 7

Angesetzte Mischung (10 ml) : 5-molare Harnstoff-Lösung
+ 3 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 5×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 300 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
36	e	6,200	2	6,161	-0,039	0,002
37	e	6,800	1	6,621	-0,179	0,032
38	e	9,000	2	9,451	0,451	0,203
39	e	8,000	1	7,792	-0,208	0,043
43	e	6,500	2	8,352	1,852	3,430
54	2	6,693	2	8,315	1,623	2,634
55	2	5,145	1	8,185	3,040	9,242
56	2	5,779	2	8,705	2,926	8,561
57	1	6,709	2	10,775	4,066	16,532
135	e	8,300	2	13,691	5,391	29,063

Anzahl der Versuche $n = 10$ Freiheitsgrade $n-1 = 9$

Varianz $s^2 = 5,993$ Standardabweichung $s = 2,448$

$t_{P=0,05} = 2,262 < t_{\text{emp}} = \underline{2,444} < t_{P=0,01} = 3,250$

Urteil : Der Unterschied ist signifikant.

Tabelle 8

Angesetzte Mischung (10 ml) : 5-molare Harnstoff-Lösung
+ 4 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 5×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 400 μ E/Trog

Nr.		x_1		y_1	d_1	d_1^2
36	e	6,600	1	7,382	0,783	0,613
37	e	7,200	2	7,514	0,314	0,099
38	e	9,500	2	10,313	0,813	0,661
39	e	8,500	2	10,137	1,637	2,680
44	e	5,700	1	7,384	1,684	2,836
45	e	8,700	2	9,544	0,844	0,712
59	e	9,500	2	9,297	-0,203	0,041
61	e	7,300	2	8,767	1,467	2,152
130	e	6,800	2	8,017	1,217	1,481

Anzahl der Versuche $n = 9$

Freiheitsgrade $n-1 = 8$

Varianz $s^2 = 0,344$

Standardabweichung $s = 0,587$

$t_{P=0,01} = 3,355 < t_{\text{emp}} = \underline{4,877} < t_{P=0,001} = 5,041$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 9

Angesetzte Mischung (10 ml) : 5-molare Harnstoff-Lösung
+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 5×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		$\bar{x}_i$		y_i	d_i	d_i^2
36	e	7,000	1	8,529	1,529	2,338
37	e	7,600	1	9,990	2,390	5,712
38	e	9,900	2	12,080	2,180	4,752
39	e	9,000	2	11,717	2,717	7,382
46	e	6,300	2	9,929	3,629	13,170
47	e	5,900	2	8,975	3,075	9,456
59	e	9,900	2	9,811	-0,089	0,008
63	e	8,400	2	9,099	0,699	0,489
71	e	10,200	2	12,059	1,859	3,456

Anzahl der Versuche $n = 9$

Freiheitsgrade $n-1 = 8$

Varianz $s^2 = 1,351$

Standardabweichung $s = 1,162$

$t_{P=0,001} = 5,041 < t_{emp} = \underline{5,165}$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 10

Angesetzte Mischung (10 ml) : 5-molare Harnstoff-Lösung
+ 10 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 5×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 1000 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
101	2	8,696	7	8,262	-0,434	0,188
109	2	11,744	8	11,551	-0,193	0,037
127	e	8,700	3	10,049	1,349	1,820
128	e	8,600	2	8,904	0,304	0,092

Anzahl der Versuche $n = 4$

Freiheitsgrade $n-1 = 3$

Varianz $s^2 = 0,625$

Standardabweichung $s = 0,791$

$t_{p=0,05} = 3,182 > t_{\text{emp}} = \underline{0,065}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 11

Angesetzte Mischung (10 ml) : 6-molare Harnstoff-Lösung
+ 0,5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 6×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 50 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
118	2	6,377	3	6,048	-0,329	0,108
119	1	5,595	4	5,675	0,080	0,006
120	2	6,472	3	6,151	-0,321	0,103
121	1	4,581	3	5,046	0,465	0,216
122	2	4,547	3	4,720	0,173	0,030

Anzahl der Versuche $n = 5$

Freiheitsgrade $n-1 = 4$

Varianz $s^2 = 0,116$

Standardabweichung $s = 0,241$

$t_{p=0,05} = 2,776 > t_{\text{emp}} = \underline{0,092}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 12

Angesetzte Mischung (10 ml) : 6-molare Harnstoff-Lösung
+ 2 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 6×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 200 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
43	e	6,100	2	6,432	0,332	0,110
50	2	5,021	2	7,665	2,644	6,991
51	2	5,938	2	9,317	3,379	11,418
52	2	6,516	2	8,559	2,043	4,174
72	e	7,900	8	9,163	1,263	1,595
74	e	9,500	3	9,410	-0,090	0,008
134	e	6,800	2	7,630	0,830	0,689
135	e	7,700	2	5,965	-1,735	3,010
131	e	9,300	2	9,865	0,565	0,319
133	e	6,700	2	7,646	0,946	0,895

Anzahl der Versuche $n = 10$

Freiheitsgrade $n-1 = 9$

Varianz $s^2 = 2,095$

Standardabweichung $s = 1,447$

$t_{P=0,1} = 1,833 < t_{\text{emp}} = \underline{2,222} < t_{P=0,05} = 2,262$

Urteil : Der Unterschied ist sehr wahrscheinlich signifikant.

Tabelle 13

Angesetzte Mischung (10 ml) : 6-molare Harnstoff-Lösung

+ 3 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 6×10^{-2} -molare Harnstoff-

Lösung + 300 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
44	2	5,447	2	7,732	2,285	5,221
45	2	7,693	1	8,797	1,104	1,219
54	2	6,693	2	8,037	1,344	1,806
55	2	5,145	1	10,093	4,948	24,483
56	2	5,779	2	8,636	2,857	8,162
57	1	6,709	1	10,067	3,358	11,276
73	e	7,400	7	8,149	0,749	0,561
74	e	9,900	5	9,733	-0,167	0,028

Anzahl der Versuche $n = 8$ Freiheitsgrade $n-1 = 7$

Varianz $s^2 = 2,688$ Standardabweichung $s = 1,639$

$t_{P=0,01} = 3,499 < t_{\text{emp}} = \underline{3,552} < t_{P=0,001} = 5,408$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 14

Angesetzte Mischung (10 ml) : 6-molare Harnstoff-Lösung
+ 4 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 6×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 400 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
44	e	5,700	2	6,244	0,544	0,296
45	e	8,700	2	8,888	0,188	0,035
54	e	7,100	1	9,672	2,572	6,615
55	e	5,800	2	8,357	2,557	6,538
56	e	6,300	2	7,868	1,568	2,459
57	e	7,600	2	10,523	2,923	8,544
75	e	8,800	7	10,815	2,015	4,060

Anzahl der Versuche $n = 7$

Freiheitsgrade $n-1 = 6$

Varianz $s^2 = 1,116$

Standardabweichung $s = 1,056$

$t_{P=0,01} = 3,707 < t_{\text{emp}} = \underline{4,429} < t_{P=0,001} = 5,959$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 15

Angesetzte Mischung (10 ml) : 6-molare Harnstoff-Lösung
+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 6×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
46	e	6,300	2	8,397	2,097	4,397
47	e	5,900	2	8,927	3,027	9,163
128	1	8,057	2	8,058	0,001	0
131	1	9,934	2	10,453	0,549	0,301
132	2	7,281	2	9,549	2,268	5,144
133	2	7,523	2	10,993	3,470	12,041
134	2	8,117	1	8,842	0,725	0,526
135	2	9,062	2	14,277	5,215	27,196

Anzahl der Versuche $n = 8$

Freiheitsgrade $n-1 = 7$

Varianz $s^2 = 2,733$

Standardabweichung $s = 1,653$

$t_{P=0,01} = 3,499 < t_{\text{emp}} = \underline{3,708} < t_{P=0,001} = 5,408$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 16

Angesetzte Mischung (10 ml) : 6-molare Harnstoff-Lösung
+ 10 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 6×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 1000 μ E/Trog

Nr.		x_1		y_1	d_1	d_1^2
103	2	10,072	7	11,111	1,039	1,080
110	2	10,011	8	12,141	2,130	4,537
124	e	11,200	2	10,485	-0,715	0,511
125	e	8,500	2	10,304	1,804	3,254

Anzahl der Versuche $n = 4$

Freiheitsgrade $n-1 = 3$

Varianz $s^2 = 1,616$

Standardabweichung $s = 1,271$

$t_{P=0,1} = 2,353 > t_{\text{emp}} = \underline{1,675}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 17

Angesetzte Mischung (10 ml) : 7-molare Harnstoff-Lösung
+ 0,5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 7×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 50 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
112	1	6,447	3	5,853	-0,594	0,353
113	2	4,749	3	4,929	0,180	0,012
114	2	5,436	3	5,874	0,438	0,192
115	2	4,871	3	5,134	0,263	0,069
117	2	5,449	3	6,134	0,685	0,469
127	2	6,456	2	6,739	0,283	0,080

Anzahl der Versuche $n = 6$

Freiheitsgrade $n-1 = 5$

Varianz $s^2 = 0,182$

Standardabweichung $s = 0,427$

$t_{P=0,2} = 1,476 > t_{\text{emp}} = \underline{1,208}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Tabelle 18

Angesetzte Mischung (10 ml) : 7-molare Harnstoff-Lösung
+ 2 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 7×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 200 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
40	e	6,700	2	7,771	1,071	1,147
41	e	6,900	2	7,628	0,728	0,530
43	e	6,100	2	8,270	2,170	4,709
50	2	5,021	2	6,622	1,601	2,563
51	2	5,938	2	7,301	1,363	1,858
52	2	6,516	3	8,264	1,748	3,056
53	2	4,541	5	6,738	2,197	4,827
67	e	7,600	2	9,461	1,861	3,463
69	e	9,500	2	8,208	-1,292	1,669

Anzahl der Versuche $n = 9$

Freiheitsgrade $n-1 = 8$

Varianz $s^2 = 1,158$

Standardabweichung $s = 1,076$

$t_{P=0,01} = 3,355 < t_{\text{emp}} = \underline{3,543} < t_{P=0,001} = 5,041$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 19

Angesetzte Mischung (10 ml) : 7-molare Harnstoff-Lösung
+ 3 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 7×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 300 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
40	e	7,100	2	7,101	0,001	0
41	e	7,700	2	8,774	1,074	1,153
44	2	5,447	2	7,136	1,689	2,853
45	2	7,693	2	9,371	1,678	2,816
50	e	5,300	3	8,276	2,976	8,857
51	e	6,600	3	8,768	2,168	4,700
53	e	5,100	3	6,875	1,775	3,151

Anzahl der Versuche $n = 7$

Freiheitsgrade $n-1 = 6$

Varianz $s^2 = 0,849$

Standardabweichung $s = 0,921$

$t_{P=0,01} = 3,707 < t_{\text{emp}} = \underline{4,664} < t_{P=0,001} = 5,959$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 20

Angesetzte Mischung (10 ml) : 7-molare Harnstoff-Lösung
+ 4 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 7×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 400 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
40	e	7,400	2	7,792	0,392	0,154
41	e	8,300	1	10,831	2,531	6,406
46	2	5,855	2	7,323	1,468	2,155
47	2	5,612	2	9,666	4,054	16,435
54	e	7,100	2	9,194	2,094	4,385
55	e	5,800	2	9,672	3,872	14,992
56	e	6,300	1	9,131	2,831	8,015
57	e	7,600	2	10,978	3,378	11,411
59	e	9,500	2	10,935	1,435	2,059
61	e	7,300	2	8,979	1,679	2,819

Anzahl der Versuche $n = 10$

Freiheitsgrade $n-1 = 9$

Varianz $s^2 = 2,500$

Standardabweichung $s = 1,581$

$t_{P=0,01} = 3,250 < t_{\text{emp}} = \underline{4,746} < t_{P=0,001} = 4,781$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 21

Angesetzte Mischung (10 ml) : 7-molare Harnstoff-Lösung
+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 7×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
40	e	7,600	2	9,153	1,553	2,412
41	e	8,800	2	10,760	1,960	3,842
46	e	6,300	2	9,662	3,362	11,303
47	e	5,900	2	10,048	4,148	17,206
59	e	9,900	2	10,562	0,662	0,438
61	e	7,500	1	8,880	1,380	1,904
63	e	8,400	2	9,306	0,906	0,821
68	e	8,300	1	10,196	1,896	3,595
70	e	10,100	2	11,200	1,100	1,210

Anzahl der Versuche $n = 9$

Freiheitsgrade $n-1 = 8$

Varianz $s^2 = 1,343$

Standardabweichung $s = 1,159$

$t_{P=0,01} = 3,355 < t_{\text{emp}} = \underline{4,883} < t_{P=0,001} = 5,041$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 22

Angesetzte Mischung (10 ml) : 7-molare Harnstoff-Lösung
+ 10 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 7×10^{-2} -molare Harnstoff-
Lösung + 1000 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
104	2	12,735	6	12,962	0,227	0,052
105	2	10,222	6	12,076	1,854	3,437
127	e	8,700	3	10,058	1,358	1,844
128	e	8,600	2	9,954	1,354	1,833
131	e	10,400	1	11,388	0,988	0,976
133	e	8,200	2	11,649	3,449	11,896
134	e	9,000	2	11,222	2,222	4,937
135	e	10,200	2	14,277	4,077	16,622

Anzahl der Versuche $n = 8$

Freiheitsgrade $n-1 = 7$

Varianz $s^2 = 1,636$

Standardabweichung $s = 1,279$

$t_{P=0,01} = 3,499 < t_{\text{emp}} = \underline{4,285} < t_{P=0,001} = 5,408$

Urteil : Der Unterschied ist hoch signifikant.

Tabelle 23

Eingesetzte Mischung (10 ml) : 8-molare Harnstoff-Lösung

+ 5 E Insulin

1 : 100 verdünnt

Eingesetzt zum Test (0,1 ml) : 8×10^{-2} -molare Harnstoff-

Lösung + 500 μ E/Trog

Nr.		x_i		y_i	d_i	d_i^2
94	e	9,100	7	8,065	-1,035	1,071
123	2	8,773	3	10,722	1,949	3,799
124	2	10,132	2	9,372	-0,760	0,578
125	2	7,875	2	9,137	1,262	1,593

Anzahl der Versuche $n = 4$

Freiheitsgrade $n-1 = 3$

Varianz $s^2 = 2,180$

Standardabweichung $s = 1,476$

$t_{P=0,6} = 0,584 > t_{\text{emp}} = \underline{0,480}$

Urteil : Der Unterschied ist nicht signifikant.

Kontrollversuch Nr. 129

Verglichen werden jeweils 2 Inkubationsansätze, und zwar 2 mit Insulin (500 μ E/Trog), 2 nur mit Inkubationslösung, die die basale Glucoseoxydation des Fettgewebes angeben, und 2 mit 5×10^{-2} -, 6×10^{-2} - und 7×10^{-2} -molarer Harnstofflösung.

Tabelle Nr. 24

Versuchsansatz	y_1
Inkubationslösung + 500 μ E/2,1 ml Insulin	8,962
Inkubationslösung + 0,1 ml einer 5×10^{-2} -mol. Harnstofflösung	5,484
Inkubationslösung + 0,1 ml einer 6×10^{-2} -mol. Harnstofflösung	5,473
Inkubationslösung + 0,1 ml einer 7×10^{-2} -mol. Harnstofflösung	5,192
Inkubationslösung + 0,1 ml Inkubationslösung	4,946

Urteil : Während das Insulin die basale Glucoseoxydation des Fettgewebes stark erhöht, verändern die Harnstoff-Lösungen diese nicht signifikant.

Harnstoff-Lösungen	Insulin/2,1 ml	Zahl der Versuche n	Standardabweichung s	t_{emp}	t_{tab}	Urteil
1-molar	500 μE	5	1,654	$1,288 < t_{P=0,05}$	$= 2,776$	kein Unterschied
2-molar	500 μE	6	1,719	$1,531 < t_{P=0,05}$	$= 2,571$	kein Unterschied
3-molar	500 μE	5	0,561	$2,721 < t_{P=0,05}$	$= 2,776$	signifikante Steigerung sehr wahrscheinlich
4-molar	500 μE	5	0,790	$1,500 < t_{P=0,05}$	$= 2,776$	kein Unterschied
5-molar	50 μE	5	0,516	$0,457 < t_{P=0,05}$	$= 2,776$	kein Unterschied
	200 μE	10	0,775	$2,486 > t_{P=0,05}$	$= 2,262$	signifikante Aktivitätssteigerung
	300 μE	10	2,448	$2,444 > t_{P=0,05}$	$= 2,262$	signifikante Aktivitätssteigerung
	400 μE	9	0,587	$4,877 > t_{P=0,01}$	$= 3,355$	signifikante Aktivitätssteigerung
	500 μE	9	1,162	$5,165 > t_{P=0,001}$	$= 5,041$	signifikante Aktivitätssteigerung

Tabelle 25 Fortsetzung 1

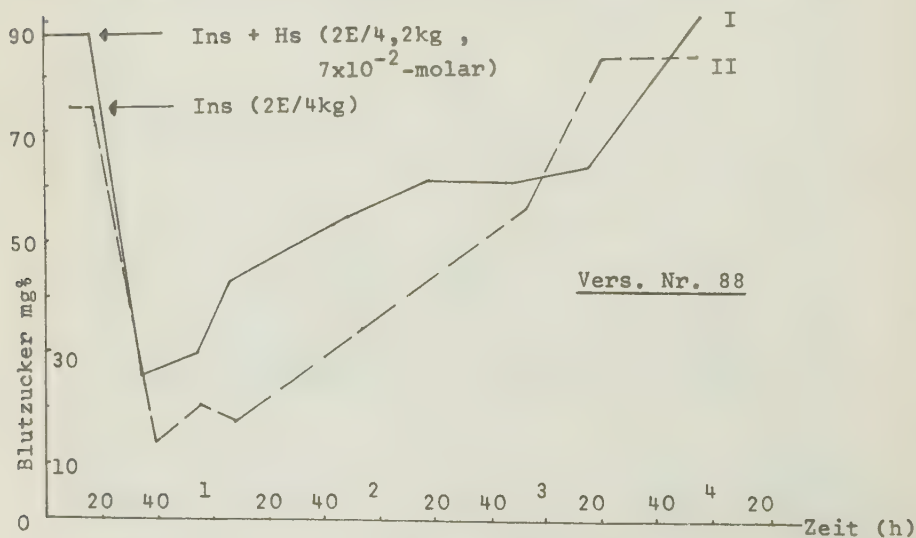
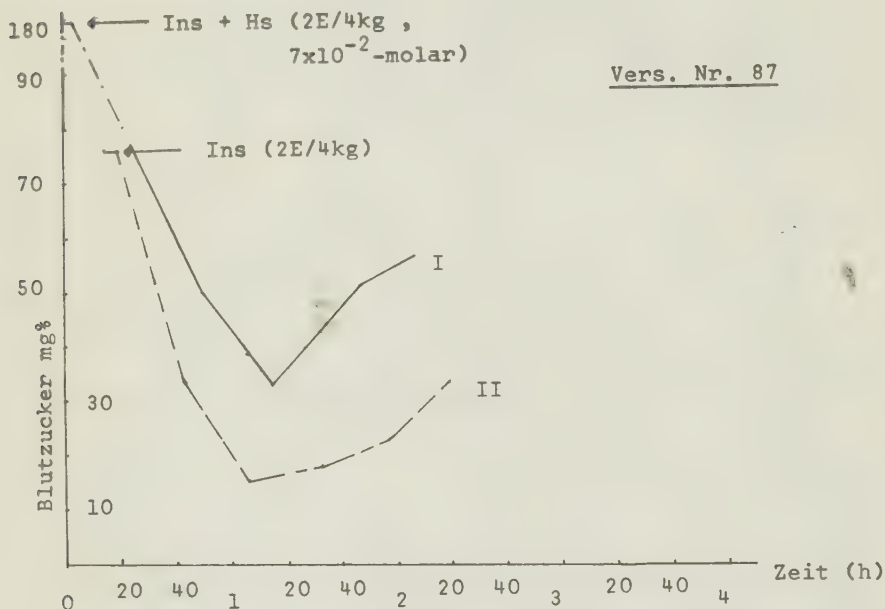
Harnstoff-Lösungen	Insulin/2,1 ml	Zahl der Versuche n	Standard- abweichung s	t_{emp}	t_{tab}	Urteil
5-molar	1000 μE	4	0,791	$0,065 < t_{P=0,05} = 3,182$		kein Unterschied
	50 μE	5	0,241	$0,092 < t_{P=0,05} = 2,776$		kein Unterschied
	200 μE	10	1,447	$2,222 < t_{P=0,05} = 2,262$		signifikante Steigerung sehr wahrscheinlich
6-molar	300 μE	8	1,639	$3,552 > t_{P=0,01} = 3,499$		signifikante Aktivitätssteigerung
	400 μE	7	1,056	$4,429 > t_{P=0,01} = 3,707$		signifikante Aktivitätssteigerung
	500 μE	8	1,653	$3,708 > t_{P=0,01} = 3,499$		signifikante Aktivitätssteigerung
	1000 μE	4	1,271	$1,675 < t_{P=0,05} = 3,182$		kein Unterschied
7-molar	50 μE	6	0,427	$1,208 < t_{P=0,05} = 2,571$		kein Unterschied

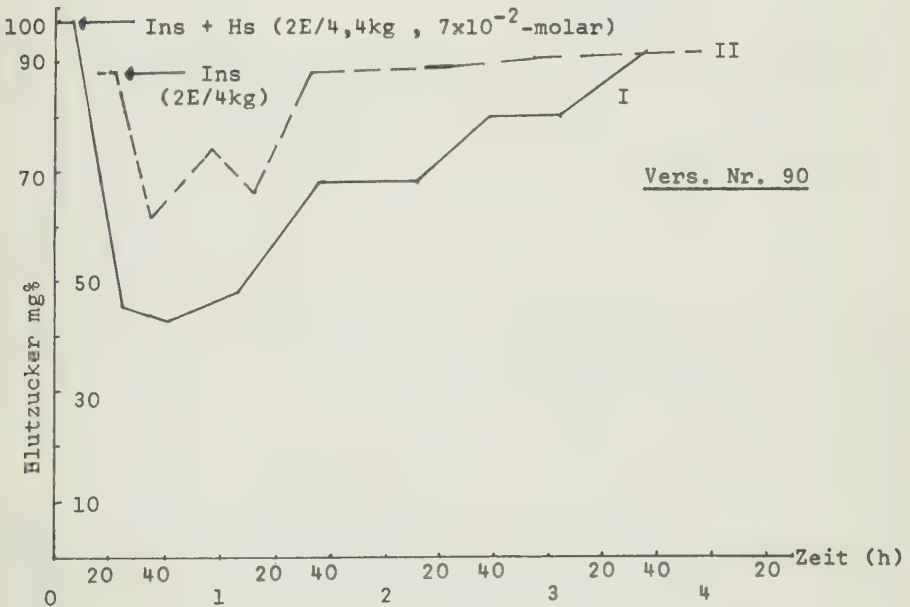
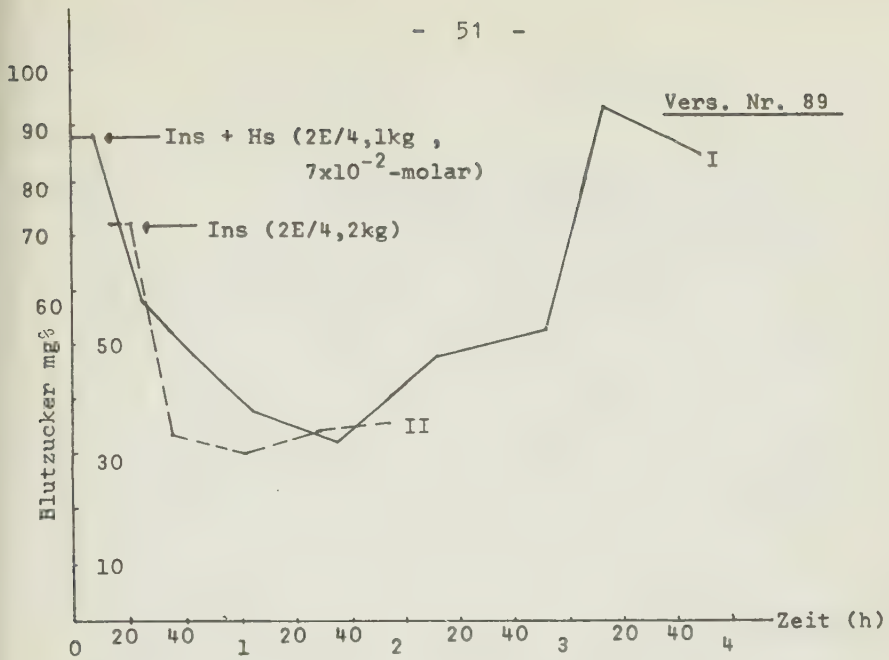
Tabelle 25 Fortsetzung 2

Harnstoff- Lösungen	Insulin/2,1 ml	Zahl der Versuche n	Standard- abweichung s	t_{emp}	t_{tab}	Urteil
7-molar	200 μE	9	1,076	$3,543 > t_{p=0,01}$	$= 3,355$	signifikante Aktivitätssteigerung
	300 μE	7	0,921	$4,664 > t_{p=0,01}$	$= 3,707$	signifikante Aktivitätssteigerung
	400 μE	10	1,581	$4,746 > t_{p=0,01}$	$= 3,250$	signifikante Aktivitätssteigerung
	500 μE	9	1,159	$4,883 > t_{p=0,01}$	$= 3,355$	signifikante Aktivitätssteigerung
	1000 μE	8	1,279	$4,285 > t_{p=0,01}$	$= 3,499$	signifikante Aktivitätssteigerung
8-molar	500 μE	4	1,476	$0,480 < t_{p=0,05}$	$= 3,182$	kein Unterschied

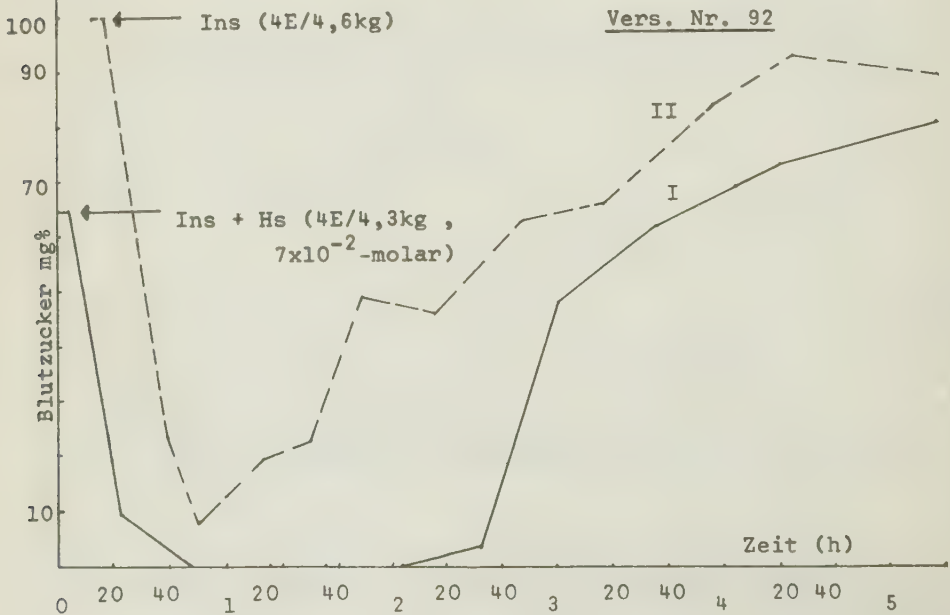
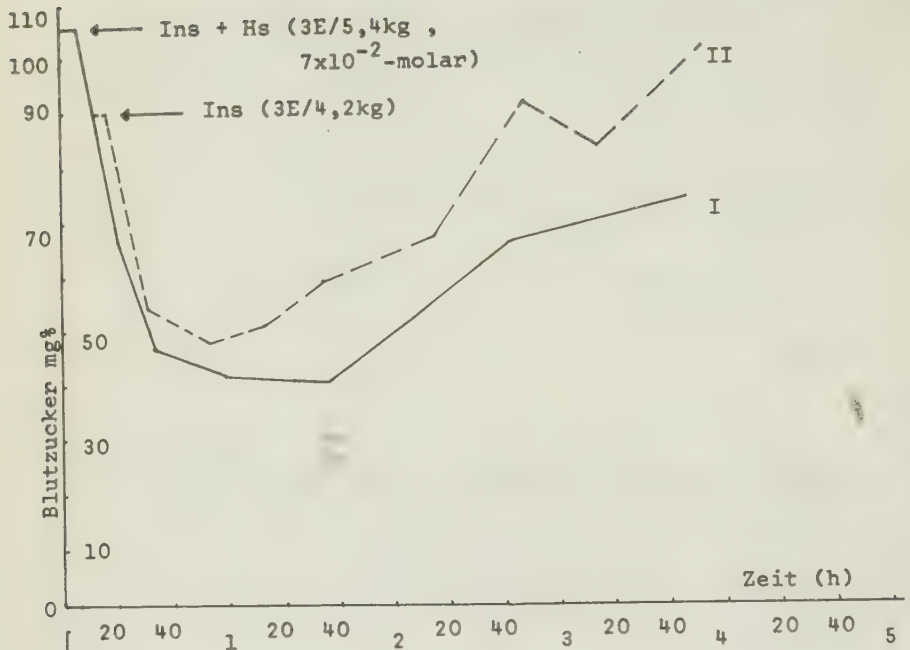
Kaninchenversuche.

Die gemessenen Blutzuckerwerte werden in ein Koordinatensystem als Funktion der Zeit eingetragen, von der Abnahme des Nüchternblutzuckers aus gerechnet.

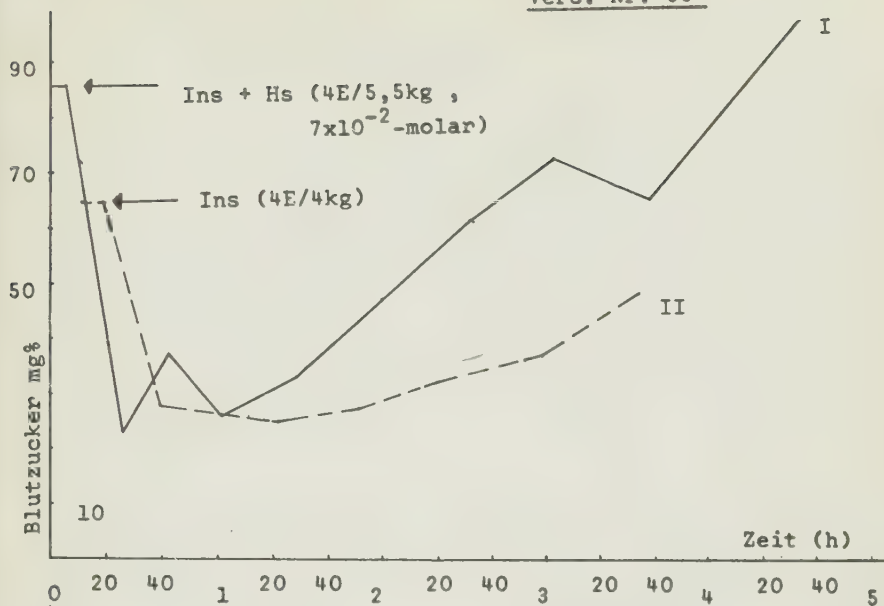




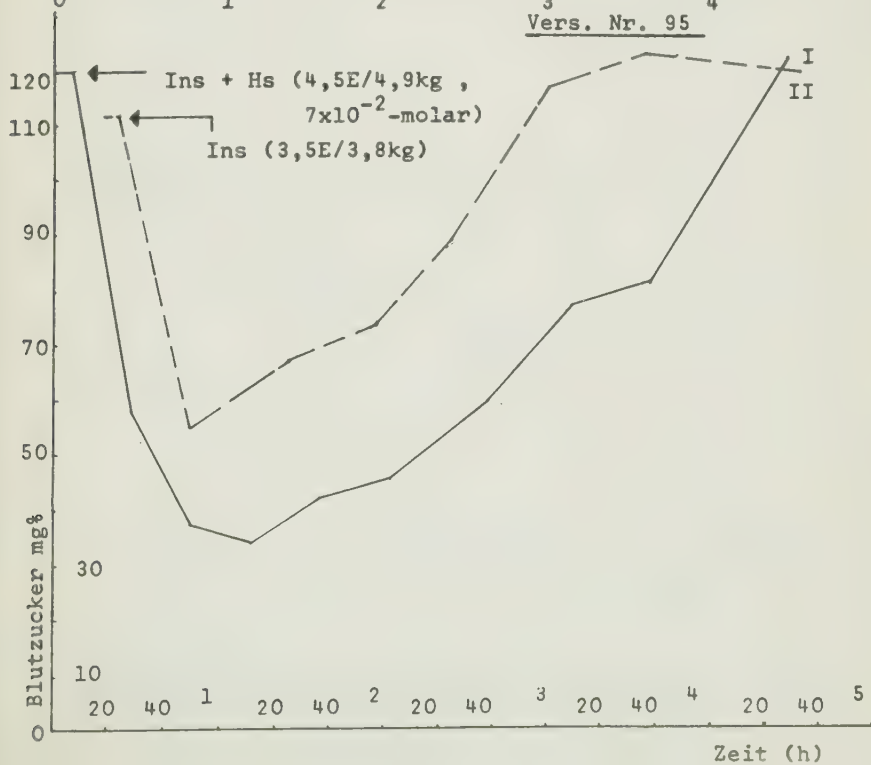
Vers. Nr. 91



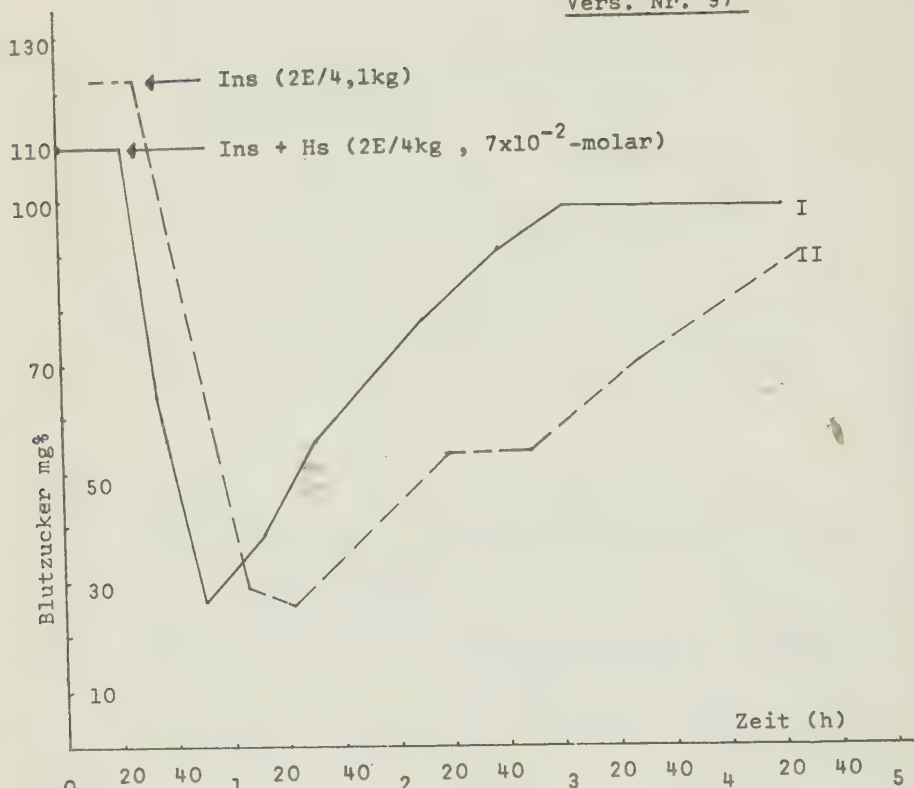
Vers. Nr. 93



Vers. Nr. 95



Vers. Nr. 97



Vers. Nr. 100

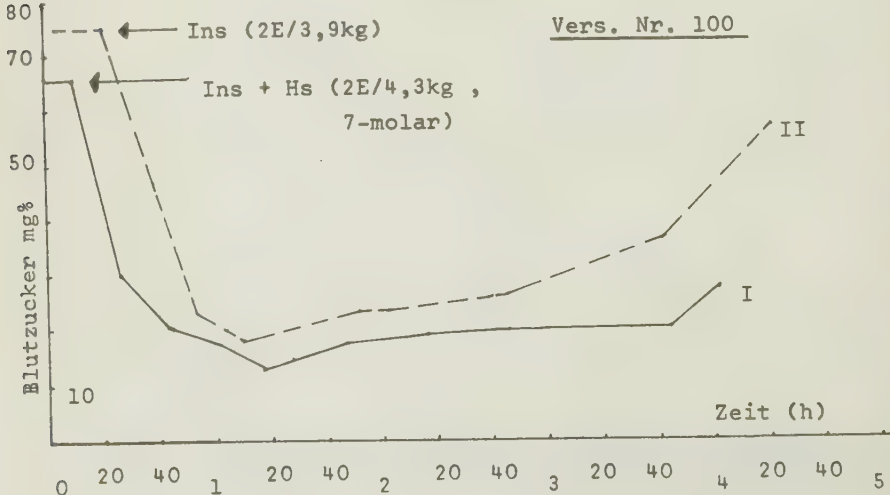


Tabelle 26

In dieser Tabelle werden die maximale Senkung des Blutzuckers durch die Insulin-Harnstoff-Mischungen einerseits und die reinen Insulin-Vergleichslösungen andererseits und die erreichten Endwerte, diese zur selben Zeit, verglichen. Die Werte werden in % der Nüchternblutzuckerwerte a angegeben.

In 7 von 10 Versuchen ist der Blutzuckerspiegel der Kaninchen, denen Insulin-Harnstoff-Mischungen injiziert wurden, stärker gesenkt und in 7 von 10 Versuchen zu Ende niedriger als der der Kaninchen, die nur reine Insulin-Lösungen erhielten.

Tabelle 26

Vers. Nr.	Injizierte Lösung	Insulin	Harn- stoff- gehalt	Nüchtern- blutzuk- kerwert a	Maximale Senkung s ₁ , s ₂			Endwerte			Endwerte zu gleicher Zeit e ₁ , e ₂			Diff. s ₁ -s ₂	Diff. e ₁ -e ₂
					Zeit	Wert mg%	in % von a	Zeit	Wert mg%	in % von a	Zeit	Wert mg%	in % von a		
87	I	2E/4kg	7x10 ⁻²	0	1 ⁰ 11	33,8	19,57	2 ⁰ 0	55,4	32,07	2 ⁰ 0	55,4	32,07	-0,1	-11,73
	II	2E/4kg	-	0	46	14,96	19,67	2 ⁰ 0	33,34	43,8		33,34	43,8		
88	I	2E/4,2kg	7x10 ⁻²	0	20	26,29	29,88	3 ⁰ 35	86,86	98,7		= 88	100,0		
	II	2E/4kg	-	0	22	13,71	18,46	3 ⁰ 36	83,43	112,3	3 ⁰ 36	83,43	112,3	+11,42	-12,3
89	I	2E/4,1kg	7x10 ⁻²	0	1 ⁰ 27	33,54	37,94	3 ⁰ 40	85,37	96,56		= 36	40,72		
	II	2E/4,2kg	-	0	41	30,49	41,68	1 ⁰ 36	35,98	49,18	1 ⁰ 36	35,98	49,18	-3,74	-8,46
90	I	2E/4,4kg	7x10 ⁻²	0	35	43,62	44,33	3 ⁰ 30	91,49	92,98		= 93	94,51		
	II	2E/4kg	-	0	14	62,23	70,05	3 ⁰ 34	92,55	104,2	3 ⁰ 34	92,55	104,2	-25,68	-9,69
91	I	3E/5,4kg	7x10 ⁻²	0	1 ⁰ 14	39,52	37,7	3 ⁰ 39	74,43	71,01		74,43	71,01	-15,62	-44,39
	II	3E/4,2kg	-	0	34	47,9	53,32	3 ⁰ 34	101,8	113,3	3 ⁰ 39	=103,7	115,4		

Tabelle 26 : Fortsetzung

Vers. Nr.	Injizierte Lösung	Harn- stoff	Nüchtern- blutzuk- kerwert a	Maximale Senkung s ₁ , s ₂			Endwerte			Endwerte zu gleicher Zeit e ₁ , e ₂			Diff. Diff. s ₁ -s ₂ e ₁ -e ₂
				Zeit	Wert mg%	in % von a	Zeit	Wert mg%	in % von a	Zeit	Wert mg%	in % von a	
92	I 4E/4,3kg	7x10 ⁻²	0	65,56	40	0	5 ⁰ 20	80,79	123,3	5 ⁰ 20	80,79	123,3	-7,9 +35,87
	II 4E/4,6kg	-	0	100,66	33	7,95	5 ⁰ 13	89,4	88,82		88,0	87,43	
93	I 4E/5,5kg	7x10 ⁻²	0	86,08	20	23,2	4 ⁰ 26	96,91	112,6	3 ⁰ 10	70	81,32	-11,45 +8,51
	II 4E/4kg	-	0	64,43	1 ⁰ 0	24,74	3 ⁰ 10	46,91	72,81		46,91	72,81	
95	I 4,5E/4,9kg	7x10 ⁻²	0	119,89	1 ⁰ 6	34,09	4 ⁰ 22	122,73	102,4	4 ⁰ 22	122,73	102,4	-19,8 -4,8
	II 3,5E/3,8kg	-	0	111,93	25	53,98	4 ⁰ 9	120,45	107,6		120	107,2	
97	I 2E/4kg	7x10 ⁻²	0	110,71	28	27,04	4 ⁰ 0	98,47	88,95	4 ⁰	98,47	88,95	+4,01 +15,44
	II 2E/4,1kg	-	0	122,45	53	25,0	3 ⁰ 58	89,29	72,92		90	73,51	
100	I 2E/4,3kg	7	0	66,15	1 ⁰ 7	13,02	4 ⁰ 5	26,56	40,15	4 ⁰ 5	26,56	40,15	+0,24 -25,17
	II 2E/3,9kg	-	0	75,0	1 ⁰ 7	14,58	4 ⁰ 3	55,47	73,96		56,5	75,32	

IV. Diskussion.

Die Steigerung der Insulinaktivität durch Harnstoff ist eine Folge der Wirkung auf das Insulinmolekül selbst. Zu denken wäre noch an eine isolierte Wirkung des Agens auf die Zellmembran und eine Erhöhung der Permeabilität für Glucose, was unsere Kontrollansätze aber ausschließen. Außerdem wird die Erklärung schon dadurch unwahrscheinlich, daß die Harnstoffkonzentration im Inkubationsmedium die des Blutes nie überschreitet, sie beträgt nämlich 3 - 24 mg%. Das native Eiweißmolekül besitzt eine einzigartige, spezifische Konfiguration. Vor allem Wasserstoff-Brücken zwischen freien Amino- und Carboxyl-Gruppen und Disulfid-Bindungen garantieren die Tertiärstruktur (1,2, 57,58). Das denaturierte Molekül dagegen ist frei, eine große Zahl von verschiedenen Konfigurationen anzunehmen, welche dann nicht mehr unverwechselbar bestimmt sind. Mirsky und Pauling (1) definierten die Denaturation als den irreversiblen Bruch der Wasserstoff-Brücken und erklärten die Wirkung eines denaturierenden Stoffes dadurch, daß er selbst mit dem Eiweißkörper Wasserstoff-Bindungen eingeht und so die einzelnen Molekülteile daran hindert, sich miteinander zu verbinden, wobei seine Affinität zu dem denaturierten Eiweiß größer ist als zu dem nativen (59). Die biologische Aktivität von nativen Proteinen soll an ihre Konfiguration gebunden sein, das denaturierte Eiweiß inaktiv sein (1, 60).

Das erste Enzym, an dem diese Hypothese entwickelt wurde, war Trypsin (7). Niedrige Harnstoffkonzentrationen veränderten seine Wirksamkeit kaum, mit steigenden nahm sie aber ab, in gesättigten Lösungen war sie schließlich vollkommen verloren. Aber diese Inaktivierung ist reversibel, wie sich später ergab (61). Damit konnte die alte Theorie, die die Nicht-Umkehrbarkeit der Reaktion verlangte, nicht mehr voll gültig sein. Schließlich wurden auch Enzyme gefunden, die nach Behandlung mit hochkonzentrierten Harnstofflösungen noch voll wirksam waren, obwohl sicher denaturiert, wenn auch fraglich blieb, wie stark die Strukturveränderungen waren. Auch Insulin und Ribonuclease, die in vielen strukturellen Einzelheiten dem Insulin ähnelt, behielten in verschiedenen Versuchen mit Harnstoff ihre Wirkung. Während Bischoff (3) ein mit Harnstoff modifiziertes Insulin durch die Wirkung auf den Blutzucker des Kaninchens testete und unter 5 elektrophoretisch trennbaren und verschieden löslichen Reaktionsprodukten 4 wirksame fand (5, 4), untersuchten Barnard und Stein eine in vitro mit Harnstoff inkubierte Ribonuclease und fanden die unveränderte Aktivität wieder (9).

Ein vollkommen denaturiertes, inaktives Eiweiß zeigt keinerlei zusammenhängende, sinnvolle Strukturen mehr, ein mit hochkonzentrierten Harnstofflösungen behandeltes Protein dagegen besitzt noch Reststrukturen, was für normales γ -Globulin (62,63), Soja-Bohnen-Trypsin-Inhibitor (64), Thyreoglobulin (65), Rinder-Serumalbumin (66) und Penicillinase (67) bewiesen wurde.

Diese Reststrukturen sollen an Disulfid-Brücken gebunden sein. Damit ist die wichtigste Voraussetzung für eine Wiederherstellung des nativen Zustandes, ein erhaltenes Molekülgerüst, gegeben, und die Reversibilität der Denaturierung durch Harnstoff leichter erklärbar (68, 69). Am Beispiel der Penicillinase (67) und des Rinder-Serumalbumines (66) wurde sogar der Übergang vom α - in den β -, bzw. γ -Typ unter dem Einfluß von Harnstoff und die Rückkehr zum α -Typ nach Entfernen des Harnstoffes beobachtet.

Die Wirkung des Harnstoffes ist in einer Auffaltung des angegriffenen Moleküles zu suchen (2,63,64,70). Man kann sich diese Vorgänge als in "Etappen" ablaufende Prozesse vorstellen. Der erste Angriffspunkt am Protein ist seine Oberfläche. Durch Bildung von Wasserstoff-Brücken mit oberflächlich gelegenen Gruppen werden die elektrischen Ladungsverhältnisse gestört, was zu Verformungen führt. Es werden speziell induktive Effekte und lokale Unterschiede der Dielektrizitätskonstanten diskutiert (71). Durch die Oberflächenänderungen gelangen ursprünglich weiter innen gelegene Molekülteile an die Oberfläche, mit denen der Harnstoff in der zweiten Reaktionsstufe reagiert. Das könnte sich fortsetzen bis zur Erschöpfung aller Reaktionsmöglichkeiten. Von den Disulfid-Brücken dagegen bleiben einige erhalten. Das Ergebnis ist ein in seiner Tertiärstruktur vollkommen verändertes Eiweißmolekül.

Darüber vor allem, wieso ein aufgefaltetes Insulinmolekül wirksamer ist, können wir nur Vermutungen anstellen, da der Wirkungsmechanismus des Hormones nach wie vor ungeklärt ist. Völlig unbekannt ist, ob der Angriffspunkt des Insulines an den verschiedenen Organen und Geweben, besonders an Muskel und Fettgewebe, der gleiche ist, ob das ganze Molekül wirksam ist oder nur einzelne Teile, und ob, wenn es wirksame Untergruppen gibt, diese in den einzelnen Organen dieselben oder verschiedene sind (72,73).

Alle Theorien über eine Insulin-Wirkung lassen sich auf 2 Grundideen zurückführen : einmal soll das Hormon die Passage der Glucose durch die Zellmembran in die Zelle erleichtern (74, 75), zum anderen soll es in der Zelle auf Enzyme der verschiedenen Glucoseabbauwege wirken (76).

Wenn es wirksame Gruppen innerhalb des Moleküles des Insulines gibt - nach Langdon soll z.B. am Fettgewebe die B-Kette allein dieselben Effekte erzielen wie das intakte Molekül, die A-Kette dagegen wirkungslos sein (73) - dann müßte man daran denken, daß solche Gruppen, die vorher "versteckt" waren und nicht reagieren konnten, durch die Auffaltung an die Oberfläche gelangen und daß dann dadurch mehr Reaktionspartner zur Verfügung gestellt werden können.

Ist dagegen das Molekül in seiner Gesamtheit für alle Wirkungen verantwortlich, wäre eine gesteigerte Aktivität auf demselben Wege zu erklären wie die Wirkung des Harnstoffes auf das Insulin selbst. Denn sicher sind durch eine Auffaltung die elektrischen Ladungsverhältnisse und sterischen Eigenschaften des Moleküles verändert. Es soll verschiedene Insulin-Komponenten geben (77,78), und es liegt nahe anzunehmen, wenn man eine Wirkung des Insulines auf Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges und des Pentose-Phosphat-Cyclus voraussetzt, daß eine bestimmte sterische Form die einzig brauchbare für diese Enzym-Systeme ist. Nach Auffaltung des Insulin-Moleküles durch Harnstoff könnte ein Anteil der nicht-wirksamen Formen in diese wirkungsvolle Komponente transformiert werden. Über veränderte Ladungsverhältnisse wäre eine Aktivitätssteigerung ebenfalls zu erklären, wenn man die Auffassung zu Grunde legt, daß Insulin den Einstrom der Glucose in die Zelle fördert, und wenn man davon ausgeht, daß das aufgefaltete Insulin die Ionenverhältnisse und Membranpotentiale zu Gunsten des Zuckereinstromes beeinflußt.

Cole fand, von Arbeiten von Stark ausgehend (79), daß Cyanat, das in geringen Mengen in den Harnstofflösungen vorliegt, die terminalen Aminosäuren des Insulines carbamylisiert (80). Chromatographisch trennte Cole das mit Harnstoff behandelte Insulin in 3 Komponenten auf, von denen die, die er als ein aktives Transformationsprodukt auffaßte, den Blutzucker des Kaninchens in derselben Weise wie normales Insulin senkte (6).

Es muß dahingestellt bleiben, ob durch diese Reaktion das Hormon in eine "reaktionsfreudigere" Form übergeführt wurde und ob diese die von uns gefundene Aktivitätssteigerung am Fettgewebe verursacht.

Nach ihren Modellversuchen mit Dicarboxylsäuren bestreiten Levy und Magoulas (81), daß Harnstoff in irgendeiner Weise signifikant auf die Wasserstoff-Bindungen wirkt, ganz im Gegensatz z.B. zu den Ergebnissen von Edelhoch (82). Selbst wenn das auch für das Insulin zutreffen sollte, bleibt doch die Tatsache, daß das Molekül aufgefaltet wird und daß Reststrukturen erhalten bleiben, die es zusammenhalten. Diese sollen an die Disulfid-Brücken gebunden sein.

Die Theorie lautet also ganz allgemein, ohne auf den Mechanismus der Entstehung des letztlich resultierenden Molekülbildes einzugehen, daß Insulin in Harnstofflösungen eine bedeutende Umgruppierung seiner einzelnen Molekülteile erfährt, wobei irgendeine Verbindung gewahrt bleibt. Messungen der Fluoreszenz bestätigen diese Hypothese; da sie in Harnstoff-Lösungen steigt, müssen Tyrosin-Reste, die einzigen fluoreszierenden Anteile des Insulines, vorher auf irgendeine Weise am Fluoreszieren gehindert gewesen, im nativen Molekül versteckt gewesen sein (83). Auch verteilt sich der Einbau von ^{131}J auf die 4 Tyrosin-Rest in 8-molaren Harnstoff-Lösungen etwa gleichmäßig, während in wässrigen Lösungen das Tyrosin in Stellung A_{19} bevorzugt wird (71,85).

In Harnstoff-Lösungen sind demnach die dafür verantwortlichen Strukturbesonderheiten mit ihren Ladungsunterschieden verschwunden (71,84,85,86).

Eine erhaltene biologische Aktivität des Insulines nach Behandlung mit Harnstoff ist also gut durch die Ergebnisse vieler Forscher zu erklären, für eine Steigerung der Insulin-Aktivität können wir nur Gründe vermuten, da der Aktionsmechanismus des Hormones selbst noch ungeklärt ist. In der einzigen uns bekannten Arbeit, in der über eine gesicherte Steigerung der Aktivität eines Enzymes, der Fructose -1,6-Diphosphatase durch Harnstoff, berichtet wird, geben die Autoren keine Erklärung an (10).

Daß wir mit niedrigen Harnstoff-Konzentrationen ($1-4 \times 10^{-2}$ -molare Lösungen) keine signifikante Steigerung fanden, überrascht nicht, da in diesem Milieu nur geringe Änderungen der Molekülstruktur zu erwarten sind. 1000 μ E/Trog sind nur einmal signifikant wirksamer, nämlich in einer 7-molaren Harnstoff-Lösung. Dies verwundert ebenfalls nicht; denn bei Konzentrationen über 1000 μ E Insulin/ml verändert sich die Abhängigkeit der 2. Wurzel der gemessenen Impulsrate von dem Logarithmus der Insulin-Konzentration der Art, daß die Steigung der Geraden - im halblogarithmischen Maßstab - abnimmt und schließlich negativ wird. Deshalb können besonders hohe Aktivitätssteigerungen sich in niedrigeren Impulsraten ausdrücken und eine Hemmung vortäuschen, weshalb es nicht verlohnte, mehr Versuche mit so hohen Insulin-Konzentrationen anzustellen. Hier dürfte auch die Erklärung für das Versagen der Versuche mit 8-molaren Harnstoff-Lösungen zu suchen sein.

Daß bei 50 μ E/Trog keine Steigerungen gefunden wurden, erklärt sich einmal daraus, daß die Hormon-Menge überhaupt zu gering ist, um meßbar in ihrer Aktivität gesteigert werden zu können. Der normale Insulinspiegel des Menschen soll zwischen 20 und 500 μ E/ml, im Durchschnitt etwa 200 μ E/ml betragen (49). In unseren Versuchs-Trögen liegt die Konzentration bei $\approx 24 \mu$ E/ml, also an der unteren Grenze des normalen Bereiches. Außerdem liegt diese Hormon-Konzentration schon unter der unteren Grenze des gültigen Bereiches der Methode, Martin (43) gibt 31 μ E/ml an. Da schließlich die Methode nur Unterschiede von 10 μ E/ml sicher aufdeckt (44), müßte in diesem Fall eine Aktivitätssteigerung von gut 50 % erzielt werden, um gemessen werden zu können. Unverdünnte Harnstoff-Lösungen können nicht getestet werden; denn sie übertreffen (mit $n \times \frac{6}{2,7} \times 10^2 \text{ mg } \%$ $n=1,2,\dots, 8$) die physiologischen Konzentrationen um das 100fache und zerstören die Fettzellen, während 100fach verdünnte Lösungen genau den physiologischen Verhältnissen entsprechen.

Es erhebt sich die Frage, ob Harnstoff nicht schon in vivo die von uns gefundenen Effekte auf das Insulin-Molekül ausübt.

Zubrod et al. (90) untersuchten Kranke mit diabetischer Glomerulosclerose (Kimmelstiel-Wilson-Syndrom) und fanden, daß, wie die Nierenkrankheit fortschritt, die Patienten Insulin einsparen konnten.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Kalliomaki et al. (91), und einen ganz besonders eindrucksvollen Fall schildern Hatch und Parrish (92). Zubrod und seine Mitarbeiter glaubten deshalb an einen besonderen Diabetes-Typ, Runyan et al. (93) und Epstein et al. (94) dagegen lehnten dies ab, da sie keinen Zusammenhang zwischen der Schwere der Nierenschädigung und dem Insulin-Bedarf sahen, immerhin befanden sich auch in der Untersuchungsreihe Epsteins 6 Patienten mit signifikanter Abnahme des Insulin-Bedarfes, von denen 5 an schwerer Niereninsuffizienz starben. Experimentell zeigt sich ebenfalls eine Besserung des Diabetes mit Entwicklung einer Nephrose. Kalant et al. (95) und Ricketts et al. (96) injizierten Ratten, die durch Alloxan-Vergiftung oder partielle Pankreatektomie diabetisch geworden waren, nephrotoxisches Serum, und beide Arbeitsgruppen maßen eine verminderte Glucosurie und eine geringere Hyperglykämie.

Creutzfeldt et al. (97), die zu denselben Ergebnissen kamen, diskutierten zunächst vor allem eine erhöhte Nierenschwelle für Glucose und eine veränderte Nahrungsaufnahme während der Entwicklung der Nierenkrankheit, verworfen aber diese Gründe selbst, zumindest als für sich allein nicht ausreichend. Weiter führten sie eine erhöhte Zellpermeabilität für Glucose an, wofür sich auch Kalant (95) aussprach, und einen verminderten Insulinabbau durch ein irgendwie geschädigtes Insulinase-System der Leber. Ricketts und Wildberger (96,98) aber kamen zu der Überzeugung, daß die Niere selbst weniger Insulin

abbaut, ihre große Bedeutung für den Abbau und die Ausscheidung des Hormones ist bewiesen (99). Durch übernormale Anhäufung von Insulin wäre dann die Besserung des Diabetes zu erklären. Kalliomaki et al. (91) dagegen vermuteten, daß sich durch die Retention des Harnstoffes im Blut Sulfonylharnstoff-ähnliche Stoffe, die den Blutzucker senken, bilden.

Eine zweite Reihe von Forschungen untersuchte das Problem von der anderen Seite, nämlich ob bei Nierenkrankheiten der Kohlehydratstoffwechsel gestört ist. Überraschenderweise findet sich bei Urämikern, gleich welcher Genese, ein leichter Diabetes, teils mit, teils ohne Nüchtern-Hyperglykämie, aber immer mit Glucose-Toleranz-Testen von diabetischem Typ (100, 101, 102, 103, 104, 105, 106). Angeschuldigt wurden eine verminderte Insulin-Empfindlichkeit und ein spezifischer Effekt des Harnstoffes auf den Glucose-Stoffwechsel (100).

Während also einerseits ein Diabetes durch die Entwicklung einer Nierenkrankheit gebessert werden kann, soll andererseits der Urämiker sich in einer leichten diabetischen Stoffwechsellage befinden.

Zumindest für den ersten Befund, eine gewisse Milderung des Diabetes bei Ausbildung einer Nierenkrankheit, können wir auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine weitere Hypothese anführen, nämlich eine Aktivitätssteigerung des restlichen Insulines durch die hohen Harnstoffkonzentrationen, um so mehr, wenn sich das Hormon auch

noch wegen des Nierenversagens im Blut anhäuft. Man könnte sich dann auch vorstellen, daß die im diabetischen Koma stets erhöhten Rest-N-Werte (87) nicht nur als Folge des gestörten Eiweißstoffwechsels zu betrachten sind, sondern vielleicht auch einen Versuch des Körpers darstellen, die letzten Insulinreste zu aktivieren.

Durch tierexperimentelle Arbeiten muß diese Hypothese überprüft werden. Den zweiten Befund könnten folgende Überlegungen erklären: Mortimore (88) beschrieb eine Hemmung der Harnstoff-Ausschüttung aus der Leber durch Insulin. Wenn man sich einen Reglerkreis zwischen Insulin und Harnstoff vorstellt, könnte umgekehrt eine hohe Harnstoff-Konzentration im Blut die Insulin-Abgabe aus dem Pankreas hemmen oder auf irgendeine andere Weise den Spiegel verwertbaren Insulines im Blut senken; das ist um so leichter vorstellbar, als eine Aktivierung des Insulines durch Harnstoff, wie sie unsere Ergebnisse auch für den lebenden Organismus möglich erscheinen lassen, sonst zu einer Hypoglykämie führen könnte. Daß die Regulation nicht genau auf einen Normalzustand erfolgt, wie zumindest die Ergebnisse von Teuscher et al. (101, 102) erkennen lassen, die schon nüchtern regelmäßig einen erhöhten Blutzucker bei Kranken mit hohen Harnstoffspiegeln im Blut zeigen, ist angesichts der schweren Störung des gesamten Stoffwechsels nicht verwunderlich. Leider fehlen noch Messungen über die ILA-Spiegel im Blut

von Urämikern, vor allem wie sie sich vor und nach Hämodialyse und nach der Heilung der Krankheit verhalten. Wenn auch diese Hypothesen in keiner Weise bewiesen sind, geben unsere Ergebnisse, auch wenn sie nur in vitro gewonnen sind, doch einen möglichen Hinweis darauf, wie Harnstoff auch in vivo über eine direkte Wirkung auf Insulin den Kohlehydratstoffwechsel beeinflussen könnte.

V. Zusammenfassung

- 1.) Es wird der Einfluß von Harnstoff auf die biologische Aktivität von Insulin untersucht. Die biologische Aktivitätstestung erfolgt am Ratten-Fettgewebe, wobei Grundlage dieser Methode die Größe der $^{14}\text{CO}_2$ - Abgabe aus Glucose-1- ^{14}C ist.
- 2.) Niedrige Harnstoff-Konzentrationen (1-, 2- und 4-molar) steigern die biologische Aktivität des Insulines am epididymalen Fettgewebe nicht signifikant ($t_{\text{emp}} < t_{P=0,05}$). Die Steigerung durch eine 3-molare Harnstoff-Lösung ist sehr wahrscheinlich signifikant ($t_{P=0,1} < t_{\text{emp}} < t_{P=0,05}$).
- 3.) Nach Vorinkubation mit einer 5-, 6- und 7-molaren Harnstofflösung (1:100 verdünnt zum Test eingesetzt) wird die biologische Aktivität von 300, 400 und 500 $\mu\text{E}/2,1\text{ ml}$ signifikant gesteigert, die von 200 $\mu\text{E}/2,1\text{ ml}$ von einer 5- und 7-molaren ebenfalls (2mal mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 %, 8mal mit einer von weniger als 1 % und 1mal mit einer von weniger als 0,1 %), während die Aktivitätssteigerung von 200 $\mu\text{E}/2,1\text{ ml}$ Insulin durch eine 6-molare Harnstoff-Lösung nur sehr wahrscheinlich signifikant ist ($t_{P=0,1} < t_{\text{emp}} < t_{P=0,05}$).

- 4.) 50 μ E/Trog werden in ihrer Aktivität durch Harnstoff nicht verändert. 1000 μ E/Trog zeigen nur mit einer 7-molaren Harnstoff-Lösung eine signifikante Aktivitätssteigerung.
- 5.) 8-molare Harnstoff-Lösungen bewirken keine signifikante Aktivitätssteigerung des Hormones.
- 6.) Harnstoff-Lösungen ohne Insulin erhöhen die basale Glucose-Oxydation des Fettgewebes nicht.
- 7.) Insulin-Harnstoff-Mischungen, 7×10^{-2} - und 7-molar in Bezug auf den Harnstoff, senken den Blutzucker des Kaninchens.
- 8.) Die Effekte werden diskutiert. Die Ergebnisse werden als Folge einer Auffaltung des Insulin-Moleküles durch Harnstoff betrachtet. Es wird die Möglichkeit zur Diskussion gestellt, daß auch in vivo, in physiologischer Weise, Beziehungen zwischen Harnstoff und Insulin bestehen.

Literaturverzeichnis

- 1.) A.E. Mirsky und Linus Pauling - Proc. Nat. Acad. Sc.
USA 22, 439 (1936)
- 2.) C. B. Anfinsen und R.R. Redfield - Advances in Protein
Chemistry 11, 80 - 81 (1956).
- 3.) F.E. Bischoff - United States Patent Office 2, 704,
737 (1955)
- 4.) F. Bischoff und A.K. Bakhtiar - Jour. Amer.Chem.Soc.
78, 1343 (1956)
- 5.) F. Bischoff und A.K. Bakhtiar - Fed. Proc. 19, 162
(1960)
- 6.) R.D. Cole - Jour. Biol. Chem. 235, 2294 (1960)
- 7.) M.L. Anson und A.E. Mirsky - Jour. Gen. Phys. 17, 159
(1933)
- 8.) C.B. Anfinsen, W.F. Harrington, Aa. Hvidt, K. Linder-
strom-Lang, M. Ottesen und J. Schellman
Biochim. Biophys. Acta 17, 141 (1955)
- 9.) E.A. Barnard und W.D. Stein
Biochim. Biophys. Acta 37, 371 (1960)
- 10.) G. Mangiarotti und S. Pontremoli
Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 305 (1963)
- 11.) D. Perrin und J. Monod
Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 425 (1963)
- 12.) J. Katz und H.G. Wood
Jour. Biol. Chem. 238, 517 (1963)

- 13.) E.B. Ramseier, E.R. Froesch, P. Bally und A. Labhart -
4^e Congrès de la Fédération internationale du Diabète,
Genève 1961 - Editions médecine et hygiène, Genève
(Sonderdruck)
- 14.) G.F. Cahill jr., B. Leboeuf und A.E. Renold
Jour. Biol. Chem. 234, 2540 (1959)
- 15.) E. Wertheimer und E. Shafrir
Rec. Prog. Horm. Res. 16, 467 (1960)
- 16.) B. Jeanrenaud - Metabolism 10, 535 (1961)
- 17.) K.F. Weinges - Kli. Wo. 39, 293 (1961)
- 18.) A.I. Winegrad und A.E. Renold
Jour. Biol. Chem. 233, 267 (1958)
- 19.) A.I. Winegrad und A.E. Renold
Jour. Biol. Chem. 233, 273 (1958)
- 20.) A.I. Winegrad, W.N. Shaw, F.D.W. Lukens, W.C. Stadie
und A.E. Renold - Jour. Biol. Chem. 234, 1922 (1959)
- 21.) A.I. Winegrad und W.N. Shaw
Jour. Biol. Chem. 238, 524 (1963)
- 22.) P.J. Randle, C.N. Hales, P.B. Garland und E.A.
Newsholme - Lancet 7285, 785 (1963)
- 23.) R.J. Doisy - Endocrinology 72, 273 (1963)
- 24.) D. Reichl - Physiologia Bohemoslovenica 12, 62 (1963)
- 25.) E.G. Ball, D.B. Martin und O. Cooper
Jour. Biol. Chem. 234, 774 (1959)
- 26.) V.P. Dole - Jour. clin. Invest. 35, 150 (1956)

- 27.) R.S. Gordon jr. und A. Cherkes
Proc. Soc. Exp. Biol. 97, 150 (1958)
- 28.) R.S. Gordon, A. Cherkes und H. Gates
Jour. clin. Invest. 36, 810 (1957)
- 29.) C.N. Hales und P.J. Randle - Lancet 7285, 790 (1963)
- 30.) L. Recant, H. Alp, M. Koch und J. Eggeman
Lancet 7308, 614 (1963)
- 31.) F.G. Young, W.A. Broom und W.F. Wolff
The Mechanism of action of insulin - A Symposium
Blackwell Scientific Publications / Oxford 1960, S.165
- 32.) J.H. Hagen, J.A. Moorhouse und J. Steinberg
Metabolism 12, 346 (1963)
- 33.) L.A. Carlson und L. Orö - Metabolism 12, 132 (1963)
- 34.) K.F. Weinges und H. Wörner - Kli. Wo. 39, 238 (1961)
- 35.) H. Wörner und K.F. Weinges - Kli. Wo. 39, 243 (1961)
- 36.) E.R. Froesch und J.L. Ginsberg
Jour. Biol. Chem. 237, 3317 (1962)
- 37.) B. Jeanrenaud und A. E. Renold
Jour. Biol. Chem. 234, 3082 (1959)
- 38.) R.E. Humbel - Experientia 15, 256 (1959)
- 39.) P. M. Beigelman und I.S. Onoprienko
Metabolism 10, 162 (1961)
- 40.) P.M. Beigelman - Metabolism 9, 580 (1960)
- 41.) S.W. Milstein - Proc. Soc. Exp. Biol. 92, 632 (1956)
- 42.) M.D. Siperstein - Amer. Jour. Med. 29, 685 (1959)

- 43.) D.B. Martin, A.E. Renold und Y.M. Dagenais
Lancet 7037, 76 (1958)
- 44.) A.E. Renold, D.B. Martin, Y.M. Dagenais, J. Steinke,
R.I. Nickerson und M.C. Sheps
Jour. clin. Invest. 39, 1487 (1960)
- 45.) M.C. Sheps, R.I. Nickerson, Y.M. Dagenais, J. Steinke
D.B. Martin und A.E. Renold
Jour. clin. Invest. 39, 1499 (1960)
- 46.) J. Steinke, A. Sirek, V. Lauris, F.D.W. Lukens und
A.E. Renold - Jour. clin. Invest. 41, 1699 (1962)
- 47.) H. Ditschuneit, Chang-Su Ahn, M. Pfeiffer und
E.F. Pfeiffer - Kli. Wo. 37, 1234 (1959)
- 48.) H. Ditschuneit, E.F. Pfeiffer und H.G. Rossenbeck
Kli. Wo. 39, 71 (1961)
- 49.) A. Schrader und K. Schwarz - DMW 87, 2635 (1962)
- 50.) R. Weigel - Inaugural-Dissertation/München 1962
- 51.) G. Schäfer und H. Mehnert - Kli. Wo. 40, 654 (1962)
- 52.) F.Th. Ott und L. Recant
Proc. Soc. Exp. Biol. 112, 880 (1963)
- 53.) J.R. Leonards - Fed. Proc. 18, 272 (1959)
- 54.) H.N. Antoniadis, A.E. Renold, Y.M. Dagenais und
J. Steinke - Proc. Soc. Exp. Biol. 103, 677 (1960)
- 55.) J. Steinke, R. Camerini, A. Marble und A.E. Renold
Metabolism 10, 707 (1961)
- 56.) J. Steinke, J.S. Soeldner und A.E. Renold
Jour. clin. Invest. 42, 1322 (1963)

- 57.) H. Neurath, J.P. Greenstein, F.W. Putnam und
J.O. Erickson - Chem. Rev. 34, 157 (1944)
- 58.) T.E. Prout - Metabolism 12, 673 (1963)
- 59.) M.L. Anson und A.E. Mirsky - Jour.Gen. Phys. 17,
399 (1934)
- 60.) J.H. Northrop - Jour. Gen. Phys. 16, 323 (1932)
- 61.) J.I. Harris - Nature 177, 471 (1956)
- 62.) H. Edelhoich, R.E. Lippoldt und R. F. Steiner
Jour. Amer. Chem. Soc. 84, 2133 (1962)
- 63.) R.F. Steiner und H. Edelhoich
Jour. Amer. Chem. Soc. 84, 2139 (1962)
- 64.) H. Edelhoich und R. F. Steiner
Jour. Biol. Chem. 238, 931 (1963)
- 65.) R.F. Steiner und H. Edelhoich
Jour. Amer. Chem. Soc. 83, 1435 (1961)
- 66.) K. Imahori - Biochim. Biophys. Acta 37, 336 (1960)
- 67.) N. Citri und N. Garber
Biochim. Biophys. Acta 38, 50 (1960)
- 68.) I.M. Klotz und J. Ayers
Jour. Amer. Chem. Soc. 79, 4078 (1957)
- 69.) F.H. White jr. - Jour. Biol. Chem. 235, 383 (1960)
- 70.) W. Kauzmann - Advances in Protein Chemistry 14, 12
(1959)
- 71.) J.T. Semeijns De Vries Van Doesburgh und E. Havinga -
Biochim. Biophys. Acta 82, 96 (1964)

- 72.) L.A. AE. Sluyterman und J.M. Kwestroo-Van Den Bosch
Biochim. Biophys. Acta 38, 102 (1960)
- 73.) R.G. Langdon - Jour. Biol. Chem. 235, PC 15 (1960)
- 74.) C.R. Park, D. Reinwein, M.I. Henderson, E. Cadenas
und H.E. Morgan - Amer.Jour. Med. 29, 674 (1959)
- 75.) A. Hernández und A. Sols-Biochem. Jour. 86, 166 (1963)
- 76.) C. Villar-Palasi und J. Lerner
Biochim. Biophys. Acta 39, 171 (1960)
- 77.) F.H. Carpenter und A. Chrambach
Jour. Biol. Chem. 237, 404 (1962)
- 78.) J. Harfenist und L.C. Craig
Jour. Amer. Chem. Soc. 73, 877 (1951)
- 79.) G.R. Stark, W.H. Stein und S. Moore
Jour. Biol. Chem. 235, 3177 (1960)
- 80.) R.D. Cole - Jour. Biol. Chem. 236, 2670 (1961)
- 81.) M. Levy und J.P. Magoulas
Jour. Amer. Chem. Soc. 84, 1345 (1962)
- 82.) H. Edelhoch - Biochim. Biophys. Acta 38, 113 (1960)
- 83.) R.W. Cowgill - Arch. Biochem. Biophys. 104, 84 (1964)
- 84.) L.W. De Zoeten und O.A. De Bruin
Rec. Trav. Chim. (Pays-Bas) 80, 907 (1961)
- 85.) L.W. De Zoeten und E. Havinga
Rec. Trav. Chim. (Pays-Bas) 80, 917 (1961)
- 86.) L.W. De Zoeten und R. Van Strik
Rec. Trav. Chim. (Pays-Bas) 80, 927 (1961)

- 87.) K.W. Schneider und H. Winckler - DMW 87, 2685 (1962)
- 88.) G.E. Mortimore - Amer. Jour.Phys. 204, 699 (1963)
- 89.) R.A. Fisher und F. Yates, Statistical Tables, 5. Auflage, Oliver and Boyd, London, 1957
- 90.) C.G. Zubrod, S.L. Eversole und G.W. Dana : New Engl. J. Med. 245, 518 (1951)
- 91.) J. L. Kalliomaki, T.K. Markkanen und L.B. Sourander : Acta med. Scand. 166, 423 (1960)
- 92.) F.C. Hatch jr. und A.E. Parrish : Ann. Intern. Med. 54, 544 (1961)
- 93.) J.W. Runyan jr., D. Hurwitz und S.L. Robbins : New Engl. J. Med. 252, 388 (1955)
- 94.) F.H. Epstein und V. J. Zupa : New Engl. J. Med. 254, 896 (1956)
- 95.) N. Kalant, M. Clamen und M.M. Hoffman : Diabetes 7, 140 (1958)
- 96.) H.T. Ricketts, H.L. Wildberger und L. Regut : Diabetes 12, 155 (1963)
- 97.) W. Creutzfeldt, H. Frericks, D. Malsch und A. Moench : Arch. Exp. Path. Pharmac. 236, 392 (1959)
- 98.) H.L. Wildberger, H.T. Ricketts und L. Regut : Proc. Soc. Exp. Biol. 112, 168 (1963)
- 99.) J.W. Allgood : Diabetes 10, 7 (1961)
- 100.) G.T. Perkoff, C.L. Thomas, J.D. Newton, J.C. Sellman und F. H. Tyler : Diabetes 7, 375 (1958)

- 101.) A. Teuscher, S. Frankhauser und F.R. Küffer :
Kli. Wo. 41, 706 (1963)
- 102.) A. Teuscher : Schweiz. med. Woch. 94, 69 (1964)
- 103.) B.D. Cohen, N. Spritz, A.L. Rubin und E.B. Luckey :
Ann. Intern. Med. 54, 1062 (1961)
- 104.) B.D. Cohen : Ann. Intern. Med. 57, 204 (1962)
- 105.) U. Sagild : Acta med. Scand. 172, 405 (1962)
- 106.) F.B. Westervelt jr. und G.E. Schreiner : Ann.
Intern. Med. 57, 266 (1962)
- 107.) E. Lehnartz : Einführung in die Chemische Physiologie
11. Auflage 1959, S. 428, Springer Verlag Berlin-
Göttingen-Heidelberg
- 108.) J.S. Fruton und S. Simmonds-General Biochemistry
2. Auflage 1961, S. 526, J. Wiley & Sons, Inc
New York, London
- 109.) F. Leuthardt : Lehrbuch der physiologischen Chemie
15. Auflage 1963, S. 307, - W. De Gruyter & Co -
Berlin

Lebenslauf

Am 9.9.1939 in Potsdam als 2. Sohn der Eheleute Dr. Paul Emmerich, Landgerichtsdirektor i.R. und Rechtsanwalt, und Kriemhild, geb. Anger, geboren, besuchte ich nach der Volksschule das humanistische Ludwigsgymnasium in Saarbrücken und erhielt 1958 das Zeugnis der Reife.

In Saarbrücken begann ich zunächst Naturwissenschaften zu studieren. Nach meinem Entschluß zur Medizin legte ich 1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung in Saarbrücken ab und nach einem schweren Unfall 1960, der mich in meinen Studien um ein Jahr zurückwarf, 1962 in Homburg/Saar die ärztliche Vorprüfung. Nach weiteren Studien in Innsbruck, Homburg, Genf und München bestand ich am 16.6.1965 in München die ärztliche Prüfung.

